

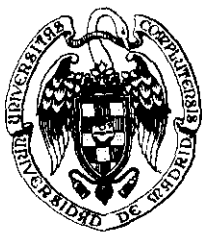
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS I

**INERVACION PEPTIDERGICA DEL CORAZON: PATRON
DE DISTRIBUCION DE SUSTANCIA P (SP), PEPTIDO
INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) Y NEUROPEPTIDO Y
(NPY).**

AUTOR: M^a ELENA MARTIN PEREZ

**DIRECTORES: Prof. Dr. JUAN CARLOS PRADOS FRUTOS
Prof. Dr. JAVIER PUERTA FONOLLA**

MADRID, 1994.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

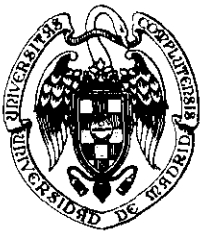
DON ANTONIO JAVIER PUERTA FONOLLA, CATEDRATICO DE ANATOMIA HUMANA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado: "INERVACION PEPTIDERGICA DEL CORAZON: PATRON DE DISTRIBUCION DE SUSTANCIA P (SP), PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) Y NEUROPEPTIDO Y (NPY)", ha sido efectuado en los laboratorios del Departamento de Ciencias Morfológicas por D^a M^a ELENA MARTIN PEREZ, encaminado a la obtención del título de Doctor en Medicina y Cirugía estimando que la memoria adjunta SI reúne las características necesarias para su presentación como Tesis Doctoral.



Fdo. Prof. Dr. D. Javier Puerta Fonollá
CATEDRATICO-DIRECTOR DEPARTAMENTO



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS

DON JUAN CARLOS PRADOS FRUTOS, PROFESOR TITULAR DE ANATOMIA HUMANA Y DON ANTONIO JAVIER PUERTA FONOLLA, CATEDRATICO DE ANATOMIA HUMANA DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MORFOLOGICAS I DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICAN:

Que el trabajo de investigación titulado: " INERVACION PEPTIDERGICA DEL CORAZON: PATRON DE DISTRIBUCION DE SUSTANCIA P (SP), PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) Y NEUROPEPTIDO Y (NPY)", ha sido realizado por D^a M^a ELENA MARTIN PEREZ, bajo nuestra dirección en los laboratorios del Departamento de Ciencias Morfológicas I reuniendo todos los requisitos para ser presentado y defendido como Tesis Doctoral.

Lo que certificamos en Madrid a 26 de Mayo de 1.994.

Fdo.: Prof. J.C. Prados Frutos

PROFESOR TITULAR

Fdo.: Prof. A.J. Puerta Fonollá

CATEDRATICO

A mis padres

INDICE

INDICE

Página

AGRADECIMIENTOS

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

INTRODUCCION

I) CONCEPTO DE NEUROTRANSMISOR, NEUROMODULADOR Y NEUROHORMONA	1
II) CONCEPTO DE NEUROPEPTIDO. DIFERENCIAS ENTRE NEUROPEPTIDOS Y NEUROTRANSMISORES CLASICOS	6
III) COEXISTENCIA DE NEUROPEPTIDOS Y NEUROTRANSMISORES CLASICOS	13
IV) SUSTANCIA P (SP)	
IV.a.- Características	17
IV.b.- Distribución de SP en el SNC	20
IV.c.- Distribución visceral de SP	24
IV.d.- Coexistencia de SP con otras sustancias neuroactivas	30
IV.e.- Acciones farmacológicas de SP	34
V) NEUROPEPTIDO Y (NPY)	
V.a.- Características	44
V.b.- Distribución de NPY en el SNC	46
V.c.- Distribución visceral de NPY	49
V.d.- Coexistencia de NPY con otras sustancias neuroactivas	54
V.e.- Acciones farmacológicas de NPY	57
VI) PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)	
VI.a.- Características	62
VI.b.- Distribución de VIP en el SNC	65
VI.c.- Distribución visceral de NPY	67
VI.d.- Coexistencia de VIP con otras sustancias neuroactivas	75
VI.e.- Acciones farmacológicas de VIP	77

VII) INERVACION CARDIACA

VII.a.- Inervación cardíaca SIMPATICA	84
VII.b.- Inervación cardíaca PARASIMPATICA	86
VII.c.- Plexos cardíacos	89
VII.d.- Interacciones simpático- parasimpático	90

MATERIAL Y METODOS

I) DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL	93
I.a.- Especie animal y condiciones gene- rales de estabulación	93
I.b.- Justificación de la especie animal	95
II) DEFINICION DE LAS ZONAS A ESTUDIAR	95
III) PREPARACION DEL TEJIDO: METODOLOGIA	96
III.a.- Obtención y fijación	96
III.b.- Inclusión	97
III.c.- Sección	98
IV) INMUNOHISTOQUIMICA	
IV.a.- ANTICUERPOS MONOCLONALES: Criterios de selección	98
IV.b.- ANTICUERPOS MONOCLONALES: Caracte- rísticas	99
IV.b.1.- SUSTANCIA P (SP)	99
IV.b.2.- PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)	100
IV.b.3.- NEUROPEPTIDO Y (NPY)	101
IV.c.- METODOLOGIA EMPLEADA	102
IV.d.- TECNICA DE CONTROL DE LAS INMUNOTINCIONES	105
V) ANIMALES TRATADOS CON 6-HIDROXI- DOPAMINA	109
VI) ANIMALES TRATADOS CON CAPSAICINA	112

RESULTADOS

I) DEFINICION DE LAS ZONAS A ESTUDIAR	114
II) PATRON DE DISTRIBUCION MORFOLOGICA DE NEUROPEPTIDOS	121
II.a.- Sistema de conducción	121
II.b.- Paredes del corazón	147
II.c.- Arterias coronarias	164
II.d.- Grandes vasos	171
III) EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON 6-HIDROXIDOPAMINA	193
IV) EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON CAPSAICINA	204

DISCUSION

I) PATRON DE DISTRIBUCION MORFOLOGICA DE SUSTANCIA P (P), NEUROPEPTIDO Y (NPY) Y PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP)	216
I.a.- Sistema de conducción	216
I.b.- Miocardio	224
I.c.- Vasos coronarios	235
I.d.- Grandes vasos	243
II) EFECTOS DERIVADOS DEL TRATAMIENTO CON 6-HIDROXIDOPAMINA	246
III) EFECTOS DERIVADOS DEL TRATAMIENTO CON CAPSAICINA	258
CONCLUSIONES	263
BIBLIOGRAFIA	267

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias al trabajo y colaboración de un grupo de personas a las que quiero expresar mi más sincero agradecimiento.

A los directores de la Tesis, los Profs. J.C. Prados Frutos y A.J. Puerta Fonollá, que gracias a su magnífica profesionalidad han hecho posible la realización de este trabajo.

Al Prof. Prados Frutos, porque además de inculcarme su espíritu de trabajo y su afán de investigación, su interés, entusiasmo y dedicación en todos los momentos me han hecho encontrar en él a un verdadero amigo.

Al Prof. Puerta Fonollá, en cuya Cátedra realicé mi trabajo de investigación. Su extraordinario amor al trabajo, su comprensión y tolerancia han sido un constante estímulo para mí.

Al Prof. Angel Peña Meilán, por su amistad y apoyo así como por sus consejos y colaboración en la elaboración de esta tesis.

Al Prof. Fermín Viejo, por su ayuda y asesoramiento en las técnicas de Inmunofluorescencia que han conducido a la elaboración de esta tesis doctoral.

Durante los años de trabajo en el Dpto. C.C. Morfológicas I de la Facultad de Medicina (UCM), he tenido la oportunidad de conocer y entablar amistad con los Profs. P. Gil Loyzaga, J. Pérez de Miguelsanz, M. Forcada, C. Martínez y M. Rhode, que me han ayudado siempre que lo he necesitado.

A Carmen Benito y Alicia Cerro, que me transmitieron de forma escrupulosa sus conocimientos en las técnicas histológicas sin los que no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del Dpto. C.C. Morfológicas I de la Facultad de Medicina que, de una u otra manera, me ayudaron en este trabajo y siempre me prestaron su máxima colaboración.

A mi amigo Manuel Lozano, por su colaboración en el procesamiento informático.

A todos mis compañeros del Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo del Hospital de la Princesa, por sus enseñanzas, amistad y apoyo incondicional, estimulándome en todo momento en mi trabajo diario así como por las facilidades

personales y los medios que pusieron a mi disposición para realizar la presente Tesis Doctoral.

Mi agradecimiento al Ministerio de Sanidad y Consumo, que contribuyó a que este trabajo se realizara gracias a la concesión de una Beca del Fondo de Investigación Sanitaria de la Seguridad Social (FISss 91/1219).

Quiero agradecer de forma especial el amor, comprensión y apoyo por parte de mis padres y hermanos. A mis padres, les agradezco su infinita paciencia y su disponibilidad siempre para ayudar, sin pedir nada a cambio.

A todos aquellos que de alguna forma me han ayudado a proseguir con sus ánimos y consejos en los momentos difíciles.

JUSTIFICACION Y OBJETIVOS

Clásicamente, se ha considerado que el corazón posee una inervación extrínseca constituida por neuronas simpáticas y vagales de naturaleza tanto eferente como aferente. Además, estos nervios extrínsecos están interconectados con neuronas existentes en los ganglios intracardíacos, las cuales poseen una actividad reguladora cardíaca intrínseca **(FORSSMAN, REINECKE Y WEIHE, 1982)**.

Sin embargo, en las dos décadas pasadas, el descubrimiento, aislamiento y caracterización estructural de un gran número de neuropéptidos en el corazón de los mamíferos (sustancia P (SP), péptido intestinal vasoactivo (VIP) neurotensina, neuropéptido Y (NPY), encefalina), han hecho que se modifique el concepto clásico de un control nervioso doble (adrenérgico y colinérgico) del corazón **(HÖKFELT ET AL, 1980)**.

La inervación peptidérgica cardíaca puede desempeñar un importante papel en el control neuronal extrínseco e intrínseco de diversas actividades cardíacas como el pulso cardíaco, la velocidad de conducción, la circulación coronaria, etc. La complejidad de este control aumenta si consideramos la existencia en la misma neurona de dos o más sustancias neurotransmisoras o moduladoras (los llamados neurotransmisores clásicos y los neuropéptidos) **(HÖKFELT ET AL, 1987)**. Esto supone una variabilidad histotopográfica de la inervación cardíaca con distinta proporción de transmisores almacenados en conjunto.

Debido a la amplia distribución de los neuropéptidos tanto en el Sistema Nervioso Central como en el Periférico y a sus múltiples funciones, la importancia fisiológica de los nervios que contienen neuropéptidos en el corazón no está del todo bien conocida.

Por todo ello, los objetivos de este trabajo fueron:

1.- Estudiar la distribución de la inervación peptidérgica del corazón, realizando una descripción detallada de la distribución de tres neuropéptidos (Sustancia P (SP), Neuropéptido Y (NPY) y Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)) en distintas zonas del mismo.

2.- Basándonos en que la simpatectomía química con 6-hidroxidopamina (6-OH-DA) origina una degeneración de los terminales nerviosos simpáticos cardíacos, en el presente estudio, intentamos establecer una correlación entre la localización de NPY y los efectos de 6-OH-DA en la deplección de fibras nerviosas NPY-IR en el corazón y grandes vasos de la rata, determinar la dosis óptima para la cual la simpatectomía fuera completa y comparar estos resultados con los efectos de la 6-OH-DA sobre la distribución de SP y VIP.

3.- La capsaicina produce una degeneración selectiva de las fibras aferentes primarias nociceptivas. Basados en la deplección de SP en la médula espinal tras administración de capsaicina y la producción de analgesia prolongada a los estímulos

nociceptivos y, estableciendo, por tanto, la posibilidad de que SP es un NT nociceptivo, este estudio se llevó a cabo con el fin de:

- a) Determinar la dosis apropiada de capsaicina en ratas que produzca los mejores resultados (mayor deplección de SP en corazón y grandes vasos) sin efectos adversos.
- b) Investigar los efectos de la administración de capsaicina sobre los niveles de SP en el corazón y grandes vasos de la rata.
- c) Comparar estos resultados con la existencia o no de deplección de VIP y NPY en dichas zonas.

LISTA DE ABREVIATURAS EMPLEADAS

Ach	Acetilcolina
AD	Aurícula Derecha
AI	Aurícula Izquierda
CA	Catecolaminas
CCK	Colecistoquinina
DA-β-OHasa	Dopamina-beta-hidroxilasa
en	Endocardio
ep	Epicardio
5-HT	5-hidroxitriptamina
Haz AV	Haz aurículoventricular
ICC	Insuficiencia Cardíaca Congestiva
m	Miocardio
NKA	Neurokinina A
NKB	Neurokinina B
Nodo AV	Nodo Auriculoventricular
Nodo SA	Nodo Senoauricular
Nor	Noradrenalina
NPY	Neuropéptido Y
NPY-IR	Neuropéptido Y-Inmunorreactivo
NT	Neurotransmisor

NTS	Núcleo del Tracto Solitario
6-OH-DA	6-hidroxidopamina
PBS	Fosfato Bufer Salino
PFA	Parafolmaldehído
SNC	Sistema Nervioso Central
SNS	Sistema Nervioso Simpático
SP	Sustancia P
SP-IR	Sustancia P-Inmunorreactivo
TRH	Hormona liberadora de Tirotopina
VCS	Vena Cava Superior
VD	Ventrículo Derecho
VI	Ventrículo Izquierdo
VIP	Péptido Intestinal Vasoactivo
VIP-IR	VIP-Inmunorreactivo

INTRODUCCION

D) CONCEPTO DE NEUROTRANSMISOR, NEUROMODULADOR Y NEUROHORMONA.

El concepto de neurotransmisor comenzó con **OTTO LOEWI (1921)** al demostrar la liberación de Acetilcolina (ACh) de los terminales nerviosos del nervio vago en el corazón y propuso que esta sustancia era el mediador de la influencia parasimpática inhibidora que el nervio vago ejerce sobre este órgano. Para ello, perfundió el corazón de una rana manteniendo una parte del nervio vago unida al mismo; tras estimulación eléctrica del nervio, el corazón latió con mayor lentitud. Recogió el líquido de perfusión y lo aplicó al corazón de otra rana observando que también latía más lentamente. Este líquido contenía ACh liberada por el vago.

También **HENRY DALE (1935)** demostró que la ACh actuaba en los terminales nerviosos motores voluntarios para iniciar la contracción muscular. La ACh fue, por tanto, la primera sustancia neurotransmisora identificada.

En términos generales, se puede definir un **NEUROTRANSMISOR (NT)** como la sustancia liberada en la hendidura sináptica por una neurona que actúa de forma específica sobre otra célula (neurona u órgano efector) por unión a los receptores pre o postsinápticos situados próximos al punto de liberación (**SCHWARTZ, 1985**). Hay una serie de sustancias de bajo peso molecular consideradas por la mayoría de los autores

como NT (Acetilcolina; Monoaminas: Dopamina, Noradrenalina, Adrenalina, Serotonina; Aminoácidos: GABA, Glicina, Glutamato, Aspartato) (SCHWARTZ, 1985; BRADFORD, 1988). Sin embargo, existen muchas otras sustancias en las que no se puede demostrar su verdadero papel como NT. La identificación de los NT es uno de los problemas más difíciles de toda la neurobiología; incluso con los NT formalmente aceptados como tales existen, con frecuencia, dificultades para determinar dicha función experimentalmente en una sinapsis (HÖKFELT ET AL, 1980; KRIEGER, 1986).

Los requisitos que deben ser satisfechos para que una sustancia sea considerada como NT, según GAINER Y BROWNSTEIN (1981), son:

- 1) **Anatómicos:** Presencia de la sustancia en cantidades apropiadas en los terminales presinápticos.
- 2) **Bioquímicos:** Presencia y funcionamiento de los enzimas que sintetizan la sustancia en la neurona presináptica y en los terminales, y eliminan o inactivan la sustancia en la sinapsis.
- 3) **Fisiológicos:** Demostración de que la estimulación nerviosa fisiológica provoca que la terminación presináptica libera la sustancia, y de que la aplicación iontoforética de la sustancia a la sinapsis en las cantidades apropiadas mimetiza la respuesta natural.
- 4) **Farmacológicos:** Las drogas que afectan a los distintos pasos enzimáticos tienen sus efectos esperados sobre la síntesis, almacenamiento, liberación, acción, inactivación y recaptación de la sustancia.

Otros autores (**BRADFORD, 1988**), formulan estos criterios así:

- 1) La sustancia debe estar presente en las neuronas a partir de las cuales es liberada.
- 2) En las neuronas deben existir enzimas capaces de sintetizar la sustancia.
- 3) Existencia de precursores y otros compuestos que formen parte de la ruta de biosíntesis.
- 4) La liberación dependiente del calcio de la sustancia a los líquidos extracelulares, ha de tener lugar durante la descarga del potencial de acción por la neurona o durante la despolarización local desde sus terminales axonales.
- 5) El tejido próximo a la neurona en cuestión posee mecanismos para la inactivación de la sustancia, una vez que ésta ha sido liberada.
- 6) La sustancia imita exactamente la acción postsináptica del NT liberado en la hendidura sináptica cuando se pone en contacto con la sinapsis. La aplicación del posible NT a las neuronas postsinápticas debe duplicar el efecto de los acontecimientos observados en estado natural: por ejemplo, un NT debe cambiar la permeabilidad de la membrana postsináptica frente a determinados tipos de iones.
- 7) Los agentes farmacológicos, tales como los antagonistas, que interactúan con el NT liberado, interactúan también, y de forma idéntica, con la sustancia añadida.
- 8) En la región tisular que contiene la sinapsis han de demostrarse receptores específicos para la sustancia neurotransmisora.

Para que una sustancia sea considerada como verdadero NT, **ORREGO (1979)** propuso que debía cumplir tres criterios primarios y tres secundarios.

Los primarios son:

- Localización de la sustancia en vesículas dentro de las neuronas.
- Liberación durante la estimulación eléctrica.
- Acción semejante a la obtenida tras estimulación de la vía nerviosa en cuestión cuando la sustancia se aplica localmente.

Los criterios secundarios son:

- Antagonismo farmacológico.
- Existencia de un sistema de biosíntesis.
- Distribución diferencial.

No obstante, aunque la sustancia puede no ser un neurotransmisor por definición, puede ejercer alguna influencia reguladora sobre la célula diana, actuando como cotransmisor o neuromodulador.

Además de los NT, existe una serie de sustancias funcionalmente distintas denominadas **NEUROMODULADORES** que se liberan a partir de una sinapsis o varicosidad nerviosa actuando a nivel postsináptico local o a distancia, modificando la acción del NT, ampliándola o atenuándola (sin llevar a cabo una acción postsináptica directa) o actuando sobre la cantidad de NT liberado (actúa sobre el receptor presináptico influyendo en la liberación o la síntesis de un NT) (**BURNSTOCK, 1985; CIARLEGLIO, BEINFELD y WESTFALL, 1993**). Un ejemplo de neuromodulación es la interacción del sistema de benzodiazepinas con los receptores GABA postsinápticos. Al liberarse juntos, GABA y benzodiazepinas, éstas últimas actúan en algún punto del

receptor postsináptico donde actúa GABA y son capaces de aumentar o disminuir el paso del ion Cl iniciado por GABA ejerciendo un efecto de refuerzo sobre la acción de esta sustancia (**BRADFORD, 1988**).

Además existe otro tipo de sustancias denominadas NEUROHORMONAS que, tras ser liberadas desde su lugar de síntesis al torrente sanguíneo o al líquido extracelular, son transportadas hasta las células sobre las que actúan ejerciendo su acción sobre una población de receptores distantes (**BURNSTOCK, 1985**).

II) CONCEPTO DE NEUROPEPTIDO. DIFERENCIAS ENTRE NEUROPEPTIDOS Y NEUROTRANSMISORES CLASICOS.

A partir de la década de los setenta, se aislaron y caracterizaron una serie de sustancias candidatas a NT, los **PEPTIDOS NEUROACTIVOS**, de estructura química distinta a los NT clásicos (cadenas cortas de aminoácidos) y presentes en cantidades muy pequeñas en diversas regiones del Sistema Nervioso (**EMSON, 1979; KRIEGER, 1986**).

Los neuropéptidos son sustancias neuroactivas muy potentes que pueden activar receptores a concentraciones mucho más bajas que los neurotransmisores clásicos. Las diferencias entre ambos quedan sistematizadas en la Tabla I (**REICHELT Y EDMINSON, 1977; HÖKFELT ET AL, 1980; KRIEGER, 1986**).

Diversas familias de péptidos, con estructura química semejante han sido descritos hasta la fecha: 1) Hormonas hipotalámicas o factores de liberación; 2) Hormonas neurohipofisarias; 3) Péptidos pituitarios; 4) Péptidos opiodes; 5) Factores de crecimiento; 6) Péptidos gastrointestinales (entre los que se encuentran, entre otros, Sustancia P, Péptido Intestinal Vasoactivo, Colecistoquinina, Gastrina, Somatostatina, Motilina, Polipéptido Pancreático) y 7) Otros péptidos (Neuropéptido Y, Calcitonina, CGRP, Bradiquinina, Angiotensina II) (**WALSH Y DOCKRAY, 1994**). Sus propiedades bioquímicas y fisiológicas difieren de las de los NT clásicos en varios aspectos:

Tabla I.

DIFERENCIAS ENTRE NEUROTRANSMISORES Y NEUROPEPTIDOS (*)

	NT	NEUROPEPTIDOS
CONCENTRACION MEDIA	ALTA	EXTREMADAMENTE BAJA
UNION A RECEPTORES	ALTA AFINIDAD	BAJA AFINIDAD
POTENCIA	BAJA	MUY ALTA
ESPEFICIDAD	GRANDE	GRANDE
VELOCIDAD DE SINTESIS	MODERADA	BAJA
TAMAÑO MOLECULA	PEQUEÑO (2-10 Carbonos)	PEQUEÑO-MEDIO (2-100 Carbonos)

(*) Tomado de REICHELT Y EDMINSON, 1977.

- **SINTESIS:** La forma de síntesis de los neuropéptidos parece ser totalmente diferente a la de los NT clásicos y tiende a seguir el patrón descrito para las hormonas proteicas y otras proteínas secretoras (Fig. 1). Se sintetizan normalmente péptidos "precursores" o "preproteínas" de tamaño mucho mayor en los ribosomas del cuerpo neuronal; se desplazan al retículo endoplásmico rugoso donde la secuencia "pre" es desintegrada produciendo una proproteína. Esta se transporta al aparato de Golgi donde puede sufrir su primera escisión, llevándose a cabo la translación y procesamiento del péptido. La secuencia del neuropéptido está habitualmente dentro del precursor donde dos aminoácidos básicos representan el lugar potencial de división por la acción sucesiva de una enzima tipo tripsina seguido de una enzima tipo carboxipeptidasa B que darán como resultado el neuropéptido activo. En los precursores, también existen lugares donde se realizan otras modificaciones como acetilación del residuo amino-terminal, glicosilación y amidación del residuo carboxiterminal que puede dar como resultado la activación o inactivación de los precursores (**SCHWARTZ, 1985; BRADFORD, 1988**).

Al igual que otras proteínas secretoras, los péptidos neuroactivos abandonan el aparato de Golgi almacenados en gránulos secretores y se trasladan a los terminales nerviosos por transporte axonal rápido para su almacenamiento y liberación. No existe síntesis local a nivel de los terminales nerviosos (**HÖKFELT ET AL, 1980**).

Estos precursores con frecuencia originan múltiples péptidos con actividades biológicas diferentes que se presentan en familias de sustancias parecidas que difieren en

NEUROTRANSMISOR

"CLASICO"

NEUROPEPTIDO

PRODUCCION:

- 1) Enzimas de síntesis.
- 2) Vesículas de almacenamiento.

PRODUCCION:

- 1) Péptido (precursor)
- 2) Vesículas de almacenamiento.
- 3) Enzimas de conversión.

TRANSPORTE AXONAL:

- 1) Enzimas de síntesis.
- 2) Vesículas de almacenamiento.

TRANSPORTE AXONAL:

- 1) Vesículas de almacenamiento.

ACUMULACION DE
NEUROTRANSMISOR:

- 1) Transporte axonal + almacenamiento
- 2) Síntesis de novo.
- 3) Recaptación.

ACUMULACION DE
NEUROPEPTIDO:

- 1) Transporte axonal + almacenamiento.

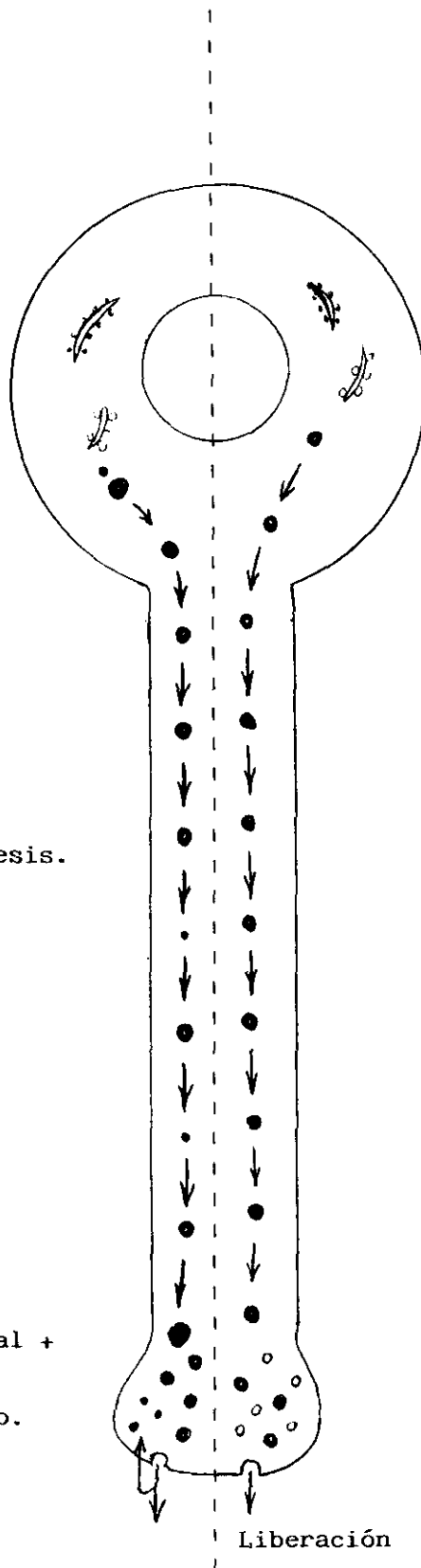


Fig. 1,- DIFERENCIAS ENTRE NEURONAS CON NEUROTRANSMISORES CLASICOS Y NEUROPEPTIDOS (Tomado de Hökfelt et al, 1980).

tamaño; cada miembro de una familia determinada puede ser más abundante en un órgano o región cerebral distinto. El que exista un neuropéptido u otro en un tejido determinado depende de la distribución de los enzimas existentes en las células nerviosas de dicha región; es decir, el procesamiento de los precursores es distinto de forma tejido-dependiente (LYNCH Y SNYDER, 1986).

- **ALMACENAMIENTO:** La acumulación de NT clásicos a nivel de las terminaciones nerviosas se puede realizar mediante síntesis enzimática en las mismas, recaptación desde el espacio extraneuronal (sináptico) a través de un mecanismo de membrana activo y por almacenamiento en vesículas que por transporte axonal proceden del cuerpo neuronal (SCHWARTZ, 1985). Ya que, como se ha expuesto previamente, no existe síntesis local de neuropéptidos en las terminaciones nerviosas y tampoco son recaptados desde la hendidura sináptica, el mecanismo propuesto para el almacenamiento de neuropéptidos es la existencia de vesículas que sintetizadas en el cuerpo neuronal alcanzan la terminación nerviosa por transporte axonal (HÖKFELT ET AL, 1980).

Los terminales nerviosos contienen al menos dos tipos de vesículas:

- a) La vesícula sináptica con diámetro aproximado de 500 Å que sólo contiene transmisores clásicos.
- b) Una vesícula grande de alrededor de 1000 Å de diámetro que contiene un núcleo denso y se la llama vesícula "grande de núcleo denso" o "granular" (HÖKFELT ET AL, 1987).

Mediante estudios inmunohistoquímicos a nivel ultraestructural, se ha demostrado que los neuropéptidos parecen estar localizados en las vesículas grandes de núcleo denso coexistiendo con transmisores clásicos. Así, **PELLETIER, STEINBUSCH Y VERHOFSTAD (1981)**, demostraron que Sustancia P (SP) está presente en las vesículas grandes de núcleo denso de las terminaciones nerviosas del asta dorsal de la médula espinal. Del mismo modo, se ha visto que el Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) existe exclusivamente en las vesículas grandes de núcleo denso de las terminaciones nerviosas de la glándula salival del gato (**LUNDBERG ET AL, 1981**) y Neuropéptido Y (NPY) en las del conducto deferente de la rata (**FRIED ET AL, 1985**).

- **INACTIVACION**: El tejido nervioso dispone de tres mecanismos fundamentales para hacer desaparecer al neurotransmisor de la sinapsis (**SCHWARTZ, 1985**):

- 1) Difusión.
- 2) Degradación enzimática.
- 3) Recaptación.

El principal mecanismo propuesto para la inactivación de neuropéptidos es la degradación enzimática por peptidasas extracelulares (**LYNCH Y SNYDER, 1986**). La lenta tasa de eliminación de neuropéptidos también diferencia a estas sustancias de los NT clásicos, contribuyendo a la larga duración de su acción y hace su metabolismo más semejante al de las hormonas (**SCHWARTZ, 1985**).

- **EFFECTOS POSTSINAPTICOS**: Para ejercer su papel fisiológico, los neuropéptidos interactúan con receptores específicos que parecen ser selectivos para los diversos neuropéptidos (KAGE, LEEMAN y BOYD, 1993; REGOLI, CADIEUX Y D'ORLEANS-JUSTE, 1993; LIN ET AL, 1994). Como ejemplo, tenemos los receptores de las taquiquinas (LYNCH Y SNYDER, 1986). Esta familia de péptidos incluye SP, Péptido Kasinina de los anfibios, Péptido Fisalamina de los moluscos, Neuromedina K y Sustancia K. Existen múltiples receptores para estos péptidos. SP y Fisalamina son relativamente potentes comparados con Kasinina en la contracción del músculo liso del íleon de cobaya donde aparece el receptor sustancia P-P (SP-P) pero mucho menos potente en sus acciones en el conducto deferente o vejiga donde al receptor se le ha denominado receptor sustancia P-E (SP-E). Sustancia K, Neuromedina K y Kasinina tienen preferencia por receptores SP-E (LEE ET AL, 1982).

III) COEXISTENCIA DE PEPTIDOS CON NEUROTRANSMISORES

CLASICOS.

Según el principio de **DALE (1935)**, un nervio dado actúa a través de la liberación de una única sustancia neurotransmisora.

Mediante métodos inmunohistoquímicos (método de sección adyacente, método de doble tinción, método de dilución-tinción), se ha podido demostrar (**HÖKFELT ET AL, 1980; 1987**) que, en muchas ocasiones, los neuropéptidos se localizan en las mismas neuronas que los transmisores clásicos como Acetilcolina (ACh), 5-hidroxitriptamina (5-HT), catecolaminas, GABA, etc. estableciendo la posibilidad de que las neuronas producen, almacenan y liberan más de una molécula mensajera (transmisor clásico más péptido) o que el péptido en estas neuronas puede ser responsable de otro tipo de funciones como por ejemplo, ejercer efectos tróficos a largo plazo (**HÖKFELT ET AL, 1987**). Así, por ejemplo, se ha observado la coexistencia de 5-HT, SP y Hormona liberadora de tirotrópina (TRH) en las mismas vesículas de algunas terminaciones nerviosas de la médula espinal de diversas especies (**JOHANSSON ET AL, 1981**). A esto se le denomina **COEXISTENCIA**.

Esta coexistencia de moléculas ha sido descrita tanto en el SNC como en el periférico (**JOHANSSON ET AL, 1981; ECKENSTEIN Y BAUGHMAN, 1984;**

EVERITT ET AL, 1984; HÖKFELT ET AL, 1987; FORSGREN, 1989c; CORR, 1992; CIARLEGLIO, BEINFELD Y WESTFALL, 1993).

El significado funcional de la coexistencia no es del todo bien conocido. Habría que determinar si estos compuestos liberados simultáneamente pueden producir respuestas selectivas y diferentes. Para explicar ésto, se han propuesto diversos modelos. Uno sería que la neurona, bajo cualquier condición, libera todas las moléculas mensajeras al mismo tiempo, y que la distribución y tipo de receptores proporcionan selectividad y especificidad (selectividad postsináptica). Otro modelo, que podría complementar al anterior, es la capacidad de liberar el mensajero diferencialmente, es decir, la liberación de distintas sustancias se relaciona con el almacenamiento diferencial de las mismas (selectividad presináptica) (HÖKFELT ET AL, 1987). Otros mecanismos, quizá no bien conocidos, pueden participar en las respuestas producidas por las distintas sustancias liberadas por una neurona.

Como ya se especificó anteriormente, se ha demostrado que los péptidos se almacenan exclusivamente en las vesículas grandes de núcleo denso, mientras que los NT clásicos se almacenan tanto en estas vesículas como en las vesículas sinápticas. Por ello, se podría proponer que si existe una activación selectiva con liberación de los dos tipos de vesículas, sería posible obtener diferente liberación de transmisores de los terminales nerviosos (HÖKFELT ET AL, 1987). Esta liberación es dependiente de la frecuencia de los potenciales de acción: un impulso de baja frecuencia activa selectivamente las pequeñas vesículas liberando sólo neurotransmisores clásicos, mientras que a frecuencias

mayores o trenes de impulsos, las vesículas grandes también liberan su contenido. Por tanto, el transmisor clásico es liberado selectivamente o en combinación con uno o varios péptidos (**LUNDBERG Y HÖKFELT, 1983**).

Los diversos péptidos que coexisten en un mismo sistema pueden interaccionar de diversas formas: estimulando o inhibiendo la liberación del transmisor clásico, prolongando la transmisión e, incluso, no estar implicados directamente en la transmisión sino que pueden ejercer efectos tróficos de estimulación del crecimiento en diversas células. Uno de los ejemplos de tal interacción es la existente entre VIP y ACh (**LUNDBERG ET AL, 1981; HARA, HAMILL y JACOBOWITZ, 1985; KRIEGER, 1986**). Una de estas sustancias altera la interacción con el receptor de la otra. VIP puede aumentar hasta cuatro veces la afinidad de la Ach para los receptores muscarínicos. Si se bloquean estos receptores, existe un aumento en el número de receptores para VIP y muscarínicos de las glándulas salivales resultando una supersensibilidad tanto peptidérgica como muscarínica.

En la inervación simpática y parasimpática de los vasos sanguíneos, se ha demostrado la coexistencia de neurotransmisores clásicos y péptidos vasoactivos: VIP en nervios colinérgicos (**LUNDBERG ET AL, 1981; HARA, HAMILL Y JACOBOWITZ, 1985**) y NPY en nervios adrenérgicos (**LUNDBERG ET AL, 1983; HARA, HAMILL y JACOBOWITZ, 1985**). SP y CGRP pueden coexistir también con ACh (**PAPKA ET AL, 1981**).

Por tanto el concepto de que un nervio dado actúa por la liberación de una única sustancia neurotransmisora, **Principio de DALE (1935)**, necesitaría ser revisado ya que, se ha demostrado que la mayoría de los nervios autonómicos contienen y liberan más de un neurotransmisor (**HÖKFELT ET AL, 1980; SCHWARTZ, 1985; BURNSTOCK, 1985, 1986, 1990**).

IV) SUSTANCIA P (SP).

IV.a.- CARACTERISTICAS

VON EULER Y GADDUM (1931) demostraron, por primera vez, que extractos de intestino y cerebro de caballo contenían un factor hipotensor y espasmogénico diferente de todos los principios activos conocidos hasta entonces y a la que denominaron Sustancia P (SP). El primer intento de purificar esta sustancia se llevó a cabo por **PERNOW (1953)**. Durante el período comprendido entre los años 30 a 50, se llevaron a cabo estudios detallados sobre la distribución de SP en diversos órganos: cerebro, asta dorsal de la médula espinal, nervios periféricos, tracto gastrointestinal, etc.

El aislamiento de SP del hipotálamo bovino y su purificación completa se realizó por **CHANG Y LEEMAN (1970)**, y un año después, estos mismos autores (**CHANG, LEEMAN y NIALI, 1971**) determinaron su estructura química, que posee once aminoácidos:

H-Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Glu-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH₂

La primera síntesis de SP fue hecha por **TREGEAR ET AL (1971)**. **STUDER, TRZECIAK y LERGIER (1973)** aislaron SP de intestino de caballo, encontrando que

la composición y secuencia de aminoácidos de SP del intestino era idéntica a la del péptido sialogogo del hipotálamo bovino (**CHANG Y LEEMAN, 1970**) y al compuesto descubierto por **VON EULER Y GADDUM (1931)**.

SP se biosintetiza en los ribosomas de los cuerpos celulares nerviosos de los ganglios de la raíz dorsal de donde migra: a) en dirección CENTRAL, al asta dorsal de la médula espinal y sustancia gelatinosa y, b) PERIFERICAMENTE, a las terminaciones nerviosas de las neuronas sensitivas de los tejidos periféricos (**PERNOW, 1983; PAYAN Y GOETZL, 1987**). SP pertenece a la familia de las taquiquininas, compuesta por una serie de péptidos que comparten secuencias de aminoácidos comunes en posición C-terminal. En mamíferos se han descrito por lo menos tres taquiquininas: SP, Neuroquinina A (NKA)(o Neuroquinina Ó, Sustancia K o Neuromedina L) y Neuroquinina B (NKB)(o también Neuroquinina β o Neuromedina K) (**MAENO, KIYAMA Y TOHYAMA, 1993**). Estas taquinininas derivan de dos genes que codifican dos precursores, preprotaquiquinina A (PPT-A) y preprotaquiquinina B (PPT-B). El procesamiento del gen de PPT-A origina múltiples RNAm que codifican a SP sólo (alfa-PPT) o a SP y NKA (beta-PPT y gamma-PPT). El procesamiento del gen PPT-B transcribe dos RNAm que codifican una sola copia de NKB. Este procesamiento varía en las distintas especies (**LYNCH Y SNYDER, 1986; PAYAN Y GOETZL, 1987; KALIVAS, 1993**).

Estos precursores, tras ser procesados por diversas enzimas, se almacenan, como otros péptidos, en vesículas grandes de núcleo denso y alcanzan el terminal nervioso por transporte axonal, desde donde serán liberados como SP tras la estimulación eléctrica.

Una vez liberada en la hendidura sináptica, el mecanismo propuesto de inactivación de SP es la degradación enzimática por peptidasas.

- **RELACION ESTRUCTURA ACTIVIDAD DE SP:** La actividad biológica de SP reside principalmente en el fragmento C-terminal de la molécula (en el pentapéptido SP 7-11) ya que fragmentos menores son inactivos. Parece ser que el receptor para SP interactúa sólo con los 6 ó 7 aminoácidos del fragmento C-terminal mientras que la parte N-terminal sería la responsable de estabilizar la molécula (**PERNOW, 1983**). No obstante, **PIERCEY ET AL (1982)**, han observado que la administración de grandes dosis de fragmentos N-terminal, aunque no afectan el músculo liso, estimulan la secreción salivar, excitan las neuronas del asta dorsal de la médula, inducen alteraciones en la conducta y estimulan la liberación de histamina.

- **RECEPTORES:** Las funciones de las taquiquinas se llevan a cabo mediante la activación de receptores específicos que en el caso de SP, NKA y NKB son, respectivamente, NK-1, NK-2 y NK-3 (**MAENO, KIYAMA y TOHYAMA, 1993; LIN ET AL, 1994**).

En la glándula submaxilar de la rata se han caracterizado dos formas distintas de receptores para SP que difieren en la longitud de sus residuos carboxiterminal y aunque no están claras sus propiedades fisiológicas, parece ser que difieren en su capacidad para llevar a cabo desensibilización. Así, ante la existencia de un receptor para SP donde no existan lugares de fosforilación C-terminal, la infusión prolongada de SP en ratas mantiene una secreción salival mantenida, es decir, no desensibiliza (**KAGE, LEEMAN y BOYD, 1993**).

IV.b.- DISTRIBUCION DE SP EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

La mayor parte de las regiones del Sistema Nervioso Central (SNC) de todos los mamíferos, incluido el hombre, contienen concentraciones variables de SP con una distribución característica, acumulándose en gran cantidad en algunas áreas siendo casi imperceptible en otras.

Las concentraciones más elevadas de SP se encuentran en el mesencéfalo, hipotálamo y área preóptica mientras que en el cerebelo la cantidad es insignificante (**HÖKFELT ET AL, 1977; CUELLO Y KANAZAWA, 1978; LJUNGDAHL ET AL, 1978 a,b; PERNOW, 1983; CHIGR ET AL, 1991**).

En el SNC y la médula espinal de la rata, SP se encuentra en muchas de las regiones que regulan la actividad cardiovascular (**CUELLO Y KANAZAWA, 1978; LJUNGDAHL ET AL, 1978 a,b; GALLAGHER, CHAHL y LYNCH, 1992; MAENO, KIYAMA Y TOHYAMA, 1993; SYKES, SPYER Y IZZO, 1994**):

IV.b.1.- TELENCEFALO.

El complejo septal y núcleo intersticial de la estría terminal contienen muchos cuerpos celulares SP-IR con una mayor densidad en los núcleos amigdalino central y medial y en el núcleo caudado putamen. Existen plexos de fibras SP-IR en el globus pallidum, partes laterales del septum, parte caudal de la cápsula interna, hipocampo y complejo amigdalino (**LJUNGDAHL ET AL, 1978a; CUELLO Y KANAZAWA, 1978; PERNOW, 1983**).

IV.b.2.- DIENCEFALO.

Existe gran cantidad de fibras SP-IR en algunas áreas del **HIPOTALAMO**: en los núcleos preóptico medial, paraventricular, arcuato y dorsomedial del hipotálamo y en menor cantidad en los núcleos ventrales (**CUELLO Y KANAZAWA, 1978**). Alrededor del tercer ventrículo, en dirección dorso-ventral, existe un compacto grupo de fibras que se unen con el lado contralateral a nivel de la parte mas interna del núcleo supraquiasmático (**LJUNGDAHL ET AL, 1978a**).

En el TALAMO, existe inmunorreactividad para SP en diversos núcleos. La mayor densidad de fibras SP-IR se localizan en las estructuras de la línea media, alrededor de la sustancia gris periventricular (CUELLO Y KANAZAWA, 1978; LJUNGDAHL ET AL, 1978 a,b).

IV.b.3.- CEREBELO.

No existe material SP-IR en cerebelo (CUELLO Y KANAZAWA, 1978).

IV.b.4.- MESENCEFALO.

La mayor concentración de SP de todo el cerebro se encuentra en la sustancia negra (CHIGR ET AL, 1991). Se han descrito grupos de fibras SP-IR en la sustancia gris periacueductal y en la parte ventral y dorsal del núcleo parabraquial (LJUNGDAHL ET AL, 1978b). También existe una intensa inmunofluorescencia en el fascículo retroflexo, es decir, en la vía que conecta la habénula con el núcleo interpeduncular (PERNOW, 1983).

Rodeando el núcleo interpeduncular existe gran cantidad de cuerpos celulares inmunorreactivos en la llamada región A10 de los cuerpos celulares dopaminérgicos (área tegmentaria ventral)(CUELLO Y KANAZAWA, 1978; KALIVAS, 1993).

IV.b.5.- ROMBENCEFALO.

A todo lo largo de la línea media existe una delicada red de fibras que contienen SP siendo su concentración mayor en los siguientes núcleos: núcleo del rafe dorsal, núcleo central superior, núcleo del rafe de la protuberancia y núcleo del rafe magnus. También en el locus ceruleus, núcleo vestibular medial y núcleos parabraquiales dorsales y ventrales.

Se observa una SP-inmunofluorescencia muy intensa en la sustancia gelatinosa del núcleo del tracto espinal del trigémino, sobre todo en su porción caudal (**PERNOW, 1983; CHIGR ET AL, 1991**). También el núcleo motor del nervio vago y el núcleo del tracto solitario (fundamentalmente en su parte comisural e intermedia) muestran una red muy compacta de fibras fluorescentes (**LJUNGDAHL ET AL, 1978b; CHIGR ET AL, 1991**). Fibras SP-IR penetran en el tronco cerebral a través de los nervios trigémino, facial y glossofaríngeo (**CUELLO Y KANAZAWA, 1978**).

IV.b.6.- MEDULA ESPINAL.

Los cuerpos celulares nerviosos SP-IR existen únicamente en el asta dorsal. Por el contrario, existen fibras SP-IR en todas las partes de la sustancia gris de la médula espinal (**BARBER ET AL, 1979; LJUNGDAHL ET AL, 1978a**).

La mayor densidad de fibras SP-IR se encuentra en las capas superficiales del asta dorsal (láminas I y II), y también en la parte dorsomedial del fascículo lateral y el tracto de Lissauer. Alrededor del canal central y en las astas ventrales, existe menor densidad de fibras SP-IR, próximas a motoneuronas e irradiándose a la sustancia blanca (**BARBER ET AL, 1979; CHIGR ET AL, 1991; SYKES, SPYER Y IZZO, 1994**).

IV.c.- DISTRIBUCION VISCERAL DE SP.

IV.c.1.- GANGLIOS Y NERVIOS.

Se han demostrado abundantes cuerpos celulares SP-IR en los ganglios espinales de la raíz dorsal a todos los niveles y en los ganglios simpáticos prevertebrales (ganglio mesentérico inferior, superior y celíaco) así como en los ganglios yugular, nodoso y trigémino de diversos animales, incluido el hombre (**HÖKFELT ET AL, 1977; CUELLO, DEL FIACCO Y PAXINOS, 1978; LUNDBERG ET AL, 1978; QUARTU, POLAK Y DEL FIACCO, 1993**).

Estas células son casi exclusivamente de tipo pequeño (tipo B) y parecen constituir alrededor del 20% de todas las células de estos ganglios. Entre las células se observan axones SP-positivos (fibras C o A delta) de diferente calibre y terminaciones varicosas de diverso grosor (**PERNOW, 1983; QUARTU, POLAK Y DEL FIACCO, 1993**). SP también está presente en los nervios vago, ciático, espláncnicos y frénico (**CUELLO, DEL FIACCO Y PAXINOS, 1978; LUNDBERG ET AL, 1978; PERNOW, 1983**).

IV.c.2.- APARATO GASTROINTESTINAL.

En el aparato gastrointestinal, se pueden distinguir dos tipos principales de poblaciones neuronales SP-IR que dan origen a dos tipos de nervios: a) nervios intrínsecos y b) nervios extrínsecos.

La mayor parte de las fibras nerviosas que contienen SP en la pared intestinal se originan de los cuerpos celulares de los plexos mientérico y submucoso y son, por tanto, intrínsecas. Pero también existe una inervación extrínseca que, a través de los nervios mesentéricos, llega al intestino representando fibras nerviosas sensitivas que han atravesado los ganglios simpáticos prevertebrales. También existen fibras con SP en el vago que terminan en estómago e intestino (**LUNDBERG ET AL, 1978; PERNOW, 1983; WALSH Y DOCKRAY, 1994**).

En el **ESOFAGO**, las fibras nerviosas SP-IR son particularmente numerosas en los plexos mientérico y submucoso. SP es mucho más abundante en la región inferior del esófago que en la superior (**LEANDER ET AL, 1982**).

En **ESTOMAGO**, la mayor concentración de SP se observa en el plexo mientérico. En la submucosa y lámina propia hay poca cantidad de SP mientras que la capa muscular longitudinal (sobre todo cardias y antro) presenta la mayor densidad de inmunorreactividad para SP del tracto gastrointestinal (**PERNOW, 1983**). También se

ha demostrado SP en el músculo liso vascular tanto en el cuerpo como en el antro (UCHIDA, YANO Y WATANABE, 1993).

En INTESTINO DELGADO, las fibras nerviosas SP-IR son muy abundantes en la capa muscular circular y en los plexos submucoso y mientérico así como en la muscularis mucosa y lámina propia. Son poco frecuentes en la capa muscular longitudinal (GREENWOOD ET AL, 1990). También existen fibras SP-IR asociadas a los villi de la mucosa y en el tejido conectivo así como en el epitelio (a estas últimas se les ha considerado como células enterocromafines fundamentalmente en las mucosas de duodeno y colon). Los cuerpos celulares SP-IR se localizan en los plexos submucoso (los que inervan la mucosa) y mientérico (los que inervan la capa muscular, submucosa y mucosa) (SCHULTZBERG ET AL, 1980; WALSH Y DOCKRAY, 1994).

En el COLON, la mayor densidad de SP se encuentra en el plexo mientérico y capa muscular circular. En la lámina propia, sin embargo, existen pocas fibras SP-IR (PERNOW, 1983).

Hay que resaltar que, a diferencia de las demás especies animales, el tracto gastrointestinal humano presenta muchas fibras SP-IR en la mucosa, particularmente en la lámina propia y concentrándose en mayor cantidad en el íleon, cuyos cuerpos celulares se sitúan en el plexo submucoso y no existen en el plexo mientérico (CROWE ET AL, 1992).

IV.c.3.- APARATO RESPIRATORIO.

En el tejido traqueobronquial, SP se distribuye en el músculo liso, tejido conectivo, en contacto con el epitelio respiratorio y alrededor de los vasos sanguíneos de la mucosa nasal, epiglotis, laringe, tráquea, bronquios y bronquiolos. La inervación por SP de la tráquea y bronquios se origina del nervio vago derecho mientras que la del pulmón se origina de ambos lados (ALBEGGER ET AL, 1991).

IV.c.4.- APARATO CARDIOVASCULAR.

A) CORAZON:

Se han identificado fibras nerviosas SP-IR en el corazón de diversos mamíferos (PAPKA ET AL, 1981; WHARTON ET AL, 1981; WEIHE Y REINECKE, 1981; FORSSMANN, REINECKE Y WEIHE, 1982; FURNESS ET AL, 1982; HOUGLAND Y HOOVER, 1983; URBAN Y PAPKA, 1985; DALSGAARD ET AL, 1986; PAPKA Y URBAN, 1987; GERSTHEIMER ET AL, 1988; BALUK Y GABELLA, 1989; TAY Y WONG, 1992; CORR, 1992; PRADOS FRUTOS ET AL, 1992; PRADOS FRUTOS, MARTIN PEREZ Y PUERTA FONOLLA, 1993) incluido el hombre (REINECKE, WEIHE Y FORSSMANN, 1980; WEIHE ET AL, 1981, 1983; RECHARDT ET AL, 1986; WHARTON ET AL, 1988).

Las fibras SP-IR se distribuyen en vasos coronarios y sus ramas (REINECKE, WEIHE Y FORSSMANN, 1980; WEIHE Y REINECKE, 1981; WHARTON ET AL,

1981; GULBENKIAN ET AL, 1993; PRADOS FRUTOS, MARTIN PEREZ Y PUERTA FONOLLA, 1993), plexo perivascular de arteriolas, capilares y vénulas (**WEIHE ET AL, 1981**), paralelas a las fibras miocárdicas auriculares y ventriculares y asociadas con el sistema de conducción (existe inervación de los nodos por fibras SP-IR pero no se detecta SP en los cuerpos neuronales ni en los ganglios cardíacos) (**WHARTON ET AL, 1981; GERSTHEIMER ET AL, 1988; FORSGREN, 1989b; PRADOS FRUTOS ET AL, 1992**). También se han detectado fibras en las válvulas cardíacas y en el tejido conectivo que cubre el corazón (**PAPKA ET AL, 1981; WHARTON ET AL, 1981; GERSTHEIMER ET AL, 1988**).

B) VASOS:

En algunos animales como el cobaya, prácticamente todos los lechos vasculares están inervados por fibras nerviosas sensitivas que contienen SP. En la adventicia y límite adventicia-media de los vasos sanguíneos de piel, pulpa dental, tejido traqueobronquial, tracto gastrointestinal y cerebro, existen fibras SP-IR sobre todo en las arteriolas con un patrón típico de fibras vasomotoras (**PERNOW, 1983**).

La mayor inervación por fibras SP-IR se encuentra en las grandes arterias cerca del corazón (tronco pulmonar proximal, arco aórtico, aorta torácica, tronco arterial braquiocefálico y carótidas comunes) y normalmente la inervación disminuye a medida que nos alejamos de éste hacia los vasos de calibre menor (**FURNESS ET AL, 1982**). A nivel arteriolar, la inervación es escasa. Sin embargo, en las arterias del lecho esplácnico (mesentérico, esplénico, pancreático y hepático), la inervación por SP es muy

importante al igual que en las arterias uterinas. En los miembros, la inervación es muy escasa (FURNESS ET AL, 1982).

IV.c.5.- APARATO UROGENITAL.

En el riñón de diversos mamíferos (rata, ratón, conejo, cobaya) se ha demostrado la existencia de un plexo laxo de fibras nerviosas SP-IR tanto en la corteza (asociado normalmente con los vasos) como en las pelvis renal (en relación con el músculo liso). En la parte proximal de uréter existen numerosas fibras SP-IR. En la vejiga, todas sus capas contienen SP, con acumulaciones particularmente en el trígono (BUCSICS, HOLZER Y LEMBECK, 1983).

IV.c.6.- ORGANOS DE LOS SENTIDOS.

Se han demostrado diversos neuropéptidos en las terminaciones nerviosas de la piel y membranas mucosas (mucosa oral, nasal y pulpa dentaria) (O'SHAUGHNESSY ET AL, 1981; BLOOM Y POLAK, 1983; BUCSICS, HOLZER Y LEMBECK, 1983; PERNOW, 1983). SP se distribuye en las terminaciones nerviosas libres localizadas en las papilas epiteliales y subepiteliales y en relación con los vasos sanguíneos (glándulas sudoríparas y folículos pilosos). También se han demostrado delgadas fibras SP-IR no mielinizadas asociadas con los corpúsculos de Meissner y de Krause del labio, nariz y lengua (ICHIKAWA ET AL, 1988).

Las terminaciones nerviosas SP-IR de los corpúsculos de Meissner y Krause parecen originarse de las células del ganglio trigémino SP-IR que tienen naturaleza sensitiva. La rizotomía trigeminal o la lesión electrolítica del ganglio de Gasser origina una pérdida importante de las fibras SP-IR en el lado ipsilateral y en la sustancia gelatinosa del núcleo trigeminal espinal (**CUELLO, DEL FIACCO Y PAXINOS, 1978**). La simpatectomía no afecta la concentración de fibras SP-IR, indicando el carácter sensitivo de estas fibras en los tejidos periféricos.

En el **OJO**, existe SP en todas las partes del sistema visual: Ganglio de Gasser, nervio oftálmico, en la mayor parte de las capas del ojo: la retina, iris (en el músculo esfínter, en el estroma y músculo dilatador), en los procesos ciliares (con localización preferentemente subepitelial), vasos sanguíneos y úvea anterior (**UNGER ET AL, 1981; PERNOW, 1983; JOTWANI, ITOH Y WADHWA, 1994**).

IV.d.- COEXISTENCIA DE SP CON OTRAS SUSTANCIAS

NEUROACTIVAS.

SP coexiste en los mismos sistemas neuronales con diversas sustancias: monoaminas, acetilcolina, aminoácidos y otros neuropéptidos (**JOHANSSON ET AL, 1981; PAPKA ET AL, 1981; PERNOW, 1983; LUNDBERG ET AL, 1985a; ZHU Y DEY, 1992**).

IV.d.1.- SP Y CATECOLAMINAS.

LJUNGDAHL ET AL (1978b) estudiaron la probable interacción entre dos tipos de sistemas neuronales: las neuronas que contienen catecolaminas (CA) y las neuronas SP-IR. Observaron que todas las células que contienen CA en el SNC están rodeadas por terminales nerviosos SP positivos. La mayor concentración de estas células se distribuye en torno a las neuronas dopaminérgicas en la sustancia negra y alrededor de las neuronas que contienen CA en el núcleo comisural, núcleo del tracto solitario y núcleo dorsal del nervio vago. También demostraron la coexistencia de estas sustancias en la corteza frontal media, complejo amigdalóide, núcleo caudado, núcleo accumbens, diversos núcleos hipotalámicos, núcleo del tracto solitario, núcleo del nervio vago, núcleo parabraquial y médula espinal.

Estos resultados sugieren que existen por lo menos dos tipos de interacciones entre los dos sistemas (**LJUNGDAHL ET AL, 1978b; AMERINI ET AL, 1991**):

- 1) Los terminales nerviosos que contienen SP pueden inervar las neuronas adrenérgicas.
- 2) Ambos sistemas neuronales pueden actuar juntos y modular la actividad neuronal.

Prueba de esta interacción es la demostración de que SP estimula la síntesis y utilización de CA en el cerebro. La administración intraventricular de SP aumenta la formación de DA y Nor y la desaparición de ambas en diversas zonas del cerebro.

IV.d.2.- SP, 5-hidroxitriptamina (5-HT) Y Hormona Liberadora de Tirotrópina (TRH).

Se ha demostrado la coexistencia de 5-HT, TRH y SP en las neuronas de diversos núcleos del asta ventral de la médula espinal. Algunas neuronas contienen sólo 5-HT y SP, otras sólo 5-HT y TRH y otras contienen las tres sustancias en distinta concentración. Esta coexistencia se demostró por la similitud entre los patrones de distribución de 5-HT, TRH y SP en el asta ventral y la desaparición de las tres sustancias tras la transección total de la médula espinal o la administración intraventricular de neurotoxinas que destruyen selectivamente las vías de transmisión de 5-HT (JOHANSSON ET AL, 1981).

Aunque no está del todo comprendida, esta coexistencia de sustancias neuroactivas liberadas de las mismas terminaciones nerviosas podría interactuar de forma diferente modulando la actividad del sistema nervioso (BURNSTOCK, 1985).

IV.d.3.- SP Y ACETILCOLINA (ACh).

En distintas áreas del cerebro (tracto habenuointerpeduncular e hipotálamo) así como en tejidos periféricos (médula adrenal, pared intestinal, etc.) se ha demostrado la coexistencia de SP y ACh en las mismas neuronas. Diversas observaciones sugieren que

SP tiene un efecto modulador sobre la transmisión colinérgica y parece actuar selectivamente sobre los receptores nicotínicos (**PAPKA ET AL, 1981**).

En las células de Renshaw de la médula espinal se ha demostrado que SP, a bajas dosis, inhibe los efectos excitadores inducidos por ACh, probablemente por un mecanismo postsináptico actuando selectivamente sobre los receptores nicotínicos (SP no tiene efectos inhibitorios cuando se administran agonistas muscarínicos). A dosis más altas, SP tiene efecto excitador, probablemente por liberación de ACh a nivel presináptico. Este efecto es bloqueado por los antagonistas de los receptores nicotínicos (**ICHIKAWA ET AL, 1988**).

IV.d.4.- SP Y CGRP.

Diversos estudios inmunohistoquímicos han demostrado que CGRP y SP coexisten en las fibras nerviosas aferentes que inervan el sistema cardiovascular de los mamíferos, ya que estos nervios son sensibles a la neurotoxina sensitiva capsaicina (**WHARTON ET AL, 1988; GULBENKIAN ET AL, 1993**).

La capsaicina origina despolarización selectiva de las fibras aferentes primarias tipo C no mielinizadas produciendo efectos locales como extravasación de proteínas, vasodilatación y espasmo de músculo liso, así como efectos cronotrópico e ionotrópico positivos en el corazón. **LUNDBERG ET AL (1985a)** demostraron que las neuronas sensitivas primarias sensibles a capsaicina (tipo C aferentes) contienen tanto SP como

CGRP. Tras administración de capsaicina, se liberan ambas sustancias: SP produciría extravasación de proteínas y espasmo de músculo liso pero no estimulación cardíaca que podría ser producida por CGRP (péptido con actividad vascular) (**PAPKA ET AL, 1981; LUNDBERG ET AL, 1985a; GULBENKIAN ET AL, 1993**).

IV.e.- ACCIONES FARMACOLOGICAS DE SP.

IV.e.1.- SP EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

La amplia distribución de SP en el SNC determina su amplia gama de probables funciones específicas según las regiones donde este neuropéptido se acumula:

- **HIPOTALAMO-NEUROHIPOFISIS:** SP parece ser responsable del control de la secreción de hormonal de la adenohipófisis ya que estimula la liberación de hormona del crecimiento y prolactina cuando se administra intraventricularmente e inhibe la secreción de gonadotropina (**PERNOW, 1983**).

- **TRONCO CEREBRAL:** SP modula la actividad respiratoria ejerciendo un efecto estimulador sobre la ventilación al aumentar la frecuencia y amplitud respiratoria (**PERNOW, 1983**).

- **NUCLEO DEL TRACTO SOLITARIO:** El asa aferente de los reflejos vagales y simpáticos se origina en baro y quimiorreceptores localizados en el seno carotídeo y arco aórtico. Los cuerpos celulares de estas neuronas aferentes viscerosensitivas se localizan en los ganglios petroso y nodoso y sus fibras entran en el SNC por los nervios craneales IX y X y terminan en el núcleo del tracto solitario (NTS) donde se integra la información aferente y desde aquí se distribuye a diversos núcleos del cerebro (**HELKE, O'DONOHUE Y JACOBOWITZ, 1980; HELKE, 1982**). Además, el ganglio nodoso contiene cuerpos celulares SP-IR con una concentración tres veces mayor que la existente en los ganglios de la raíz dorsal (**LUNDBERG ET AL, 1978**).

Por ello, **GILLIS ET AL (1980)** postularon la hipótesis de que SP es un neurotransmisor de los terminales nerviosos baro y quimiorreceptores que hacen sinapsis en el NTS influyendo en la actividad del sistema nervioso simpático.

Para demostrar ésto, **HAEUSLER Y OSTERWALDER (1980)**, demostraron que: a) La aplicación local de SP en el NTS origina hipotensión y bradicardia y reducción de la actividad nerviosa simpática espontánea. Estos efectos son dosis-dependientes y son compatibles con la activación del reflejo barorreceptor a nivel de la primera sinapsis. b) Cuando se aplica capsaicina (sustancia que libera SP) al NTS, se producen los mismos efectos que cuando SP se aplica localmente. c) El lugar de acción central de SP es muy importante en la naturaleza de las respuestas circulatorias: La inyección de SP en el ventrículo lateral del cerebro, produce hipertensión y taquicardia, efectos cardiovasculares opuestos a los encontrados al aplicar esta sustancia al NTS.

IV.e.2.- ACCIONES VISCERALES DE SP.

IV.e.2.1.- SP EN EL APARATO GASTROINTESTINAL.

A todo lo largo del aparato gastrointestinal, SP origina contracción marcada de las capas musculares lisas a concentraciones muy pequeñas y dosis-dependiente. Modula, por tanto, la motilidad intestinal e inicia la peristalsis (PAYAN Y GOETZL, 1987; GREENWOOD ET AL, 1990; REGOLI, CADIEUX Y D'ORLEANS-JUSTE, 1993).

Por otro lado, SP está implicado en la regulación del flujo sanguíneo local (vasodilatación neurogénica) al igual que en las funciones absortivas, secretoras y de protección del daño mucoso gástrico ya que SP se localiza en la submucosa y mucosa, especialmente en conexión con los vasos sanguíneos, glándulas secretoras y villi (PERNOW, 1983; GREENWOOD ET AL, 1990; YONEI, HOLZER Y GUTH, 1990; UCHIDA, YANO y WATANABE, 1993; GRONBECH Y LACY, 1994).

IV.e.2.2.- SP EN EL APARATO RESPIRATORIO.

SP liberada de los nervios sensitivos de las vías aéreas origina broncoconstricción, vasodilatación, edema y aumento de la secreción de moco (PERNOW, 1983; MURAI ET AL, 1992; BARNES, 1992). CORCORAN Y HAIGH (1992) demostraron que el neuropéptido SP está implicado en el control del tono broncomotor. Tras administración intravenosa de SP, disminuye la complianza, aumenta la resistencia respiratoria y

disminuye la frecuencia respiratoria, siendo por tanto un potente broncoconstrictor que actúa sobre el tono de las vías aéreas tanto a nivel central como periférico.

IV.e.2.3.- APARATO URINARIO.

SP es uno de los compuestos natriuréticos y diuréticos más potentes descritos: Aumenta el flujo sanguíneo renal, el volumen de orina y la excreción de sodio y potasio y disminuye la osmolaridad urinaria mientras que la filtración glomerular permanece sin cambios a dosis bajas, disminuyéndola a dosis altas. SP regula, por tanto, el metabolismo hídrico y estimula la liberación de Hormona antidiurética (ADH) (PERNOW, 1983; PAYAN Y GOETZL, 1987).

La alta concentración de SP en vejiga urinaria de diversas especies sugiere que esta sustancia puede tener un efecto espasmogénico del músculo liso de la misma (BUCSICS, HOLZER y LEMBECK, 1983; REGILE, CADIEUX Y D'ORLEANS-JUSTE, 1993).

IV.e.2.4.- SECRECION.

A) **GLANDULAS SALIVARES:** SP es un potente estimulante de la salivación en el perro, cobaya, rata, hamster y gallina pero no en el gato o el conejo. Este efecto sialogogo parece ser una acción directa de SP sobre las glándulas ya que no es bloqueado por atropina, propranolol o fenoxibenzamina (PERNOW, 1983).

B) SECRECION PANCREATICA: SP estimula la secreción pancreática exocrina in vivo e in vitro. Aumenta la secreción de bicarbonato, amilasa y proteínas y estimula la secreción de amilasa de las células acinares pancreáticas (**PERNOW, 1983; PAYAN Y GOETZL, 1987**).

C) SECRECION BILIAR: Junto a somatostatina, la SP es el único péptido conocido que tiene efecto anticolerético, reduciendo la excreción biliar basal (**PERNOW, 1983**).

IV.e.2.5.- ORGANOS DE LOS SENTIDOS.

A) SISTEMA VISUAL: SP produce miosis debido a un efecto directo sobre el músculo del esfínter pupilar permaneciendo su efecto miótico aún tras denervación del trigémino. También se ha propuesto que SP juega un importante papel como posible mediador primario de la respuesta ocular a los irritantes químicos produciendo hiperemia, miosis e hipertensión ocular al liberar SP de las neuronas sensitivas de la úvea anterior (**UNGER ET AL, 1981**).

B) PIEL Y MUCOSAS: La distribución de SP en las papilas epiteliales y subepiteliales y en los corpúsculos de Meissner y Krause de la piel y las membranas mucosas, sugiere la participación de este péptido en la mediación de la sensación táctil (**O'SHAUGHNESSY ET AL, 1981; BLOOM Y POLAK, 1983; ICHIKAWA ET AL, 1988**).

IV.e.2.6.- FUNCION INMUNE Y NEUROENDOCRINA.

Parece ser que SP modula las respuestas inflamatoria e inmune y puede proporcionar un sustrato para la señal neural de las células linfoides (PAYAN Y GOETZL, 1987; BELLINGER ET AL, 1990; MOORE, 1992). Los niveles de SP están elevados en procesos inflamatorios locales (PAYAN, 1989) estimulando la liberación de histamina y leucotrienos de los mastocitos, favorece la fagocitosis y aumenta la quimiotaxis de los leucocitos mononucleares y polimorfonucleares (LORTON ET AL, 1990). También estimula la inmunidad tanto humoral como celular, al aumentar la síntesis de DNA y proteínas y la proliferación de linfocitos T maduros y de inmunoglobulinas (PAYAN Y GOETZL, 1987; MOORE, 1992).

Se han demostrado receptores para SP en linfocitos, monocitos macrófagos y células mastocitarias. Diversos estudios han observado la presencia de fibras nerviosas que contienen SP en los órganos linfoides primarios y secundarios (LORTON ET AL, 1990) y en las puertas de entrada de antígenos como piel, pulmones, intestino y articulaciones (BELLINGER ET AL, 1990).

IV.e.2.7.- APARATO CARDIOVASCULAR.

SP es uno de los compuestos vasodilatadores periféricos más potentes conocidos (LOSAY ET AL, 1977; HELKE, 1982; PERNOW, 1983; SAID, 1987; OKUMURA ET AL, 1992). Dilata las arterias en diversos lechos vasculares probablemente por acción

directa sobre los receptores específicos para sustancia P, siendo este efecto vasodilatador dependiente de la presencia de endotelio vascular (**LOESCH Y BURNSTOCK, 1988; MILNER ET AL, 1989; OKUMURA ET AL, 1992; GULBENKIAN ET AL, 1993**).

COUTURE ET AL (1980) observaron que la arteria carótida común aislada es una de las preparaciones más sensibles a SP y otras quininas para medir los efectos de estas sustancias en el músculo liso vascular. Esta arteria, contraída con pequeñas concentraciones de noradrenalina, responde a SP y bradiquininas con relajaciones proporcionales a las concentraciones de ambos péptidos. De entre las diversas sustancias vasodilatadoras de naturaleza peptídica y no peptídica, estas dos sustancias son las más activas ya que sus concentraciones inhibitorias son menores de 10^{-8} M.

El papel de SP como mediador de la vasodilatación antidrómica, se ha verificado al demostrar su presencia en fibras sensitivas primarias no mielinizadas de la piel, su liberación de las terminaciones periféricas de las neuronas sensitivas durante estimulación antidrómica y sus efectos vasodilatadores tras la infusión intravenosa aumentando, además, la permeabilidad vascular con exudación de plasma (**PAYAN Y GOETZL, 1987**).

Administrada de forma intravenosa, SP origina disminución de la tensión arterial por un efecto directo sobre el músculo liso vascular (**VON EULER Y GADDUM, 1931; HELKE, 1982; CORCORAN Y HAIGH, 1992**).

SP parece no tener efectos cronotrópico o inotrópico directos sobre la función cardíaca (HELKE, 1982; LUNDBERG ET AL, 1985a; DALSGAARD ET AL, 1986; STANOVNIK, LOGENDER-MLINSEK Y ERJAVEC, 1986; CORCORAN Y HAIGH, 1992; CORR, 1992; OKUMURA ET AL, 1992). Por el contrario, ejerce una acción indirecta modulando el tono cardíaco neural (SMITH, PRIOLA Y BLOMQUIST, 1992).

IV.e.3.- SP Y DOLOR.

Los cuerpos celulares y fibras nerviosas SP-IR presentan un patrón de distribución neuroanatómico semejante al descrito para las vías responsables de la nocicepción. SP se sintetiza en los ganglios espinales donde, alrededor del 20% de los cuerpos celulares de estos ganglios contienen SP, y es transportada a través de los nervios de la raíz dorsal a las terminaciones nerviosas de las láminas I y II del asta dorsal de la médula. Los cuerpos celulares que contienen SP son de pequeño tamaño y las fibras son finas y no mielinizadas (DE KONINCK ET AL, 1992).

La lámina I se localiza en la parte más superficial del asta posterior de la médula. Contiene, entre otras, células de pequeño tamaño con grupos de axones no mielinizados, pequeñas dendritas y botones sinápticos que corresponden al núcleo posteromarginal. Las células de la lámina I responden específicamente a estímulos noxiógenos y térmicos y dan fibras para el tracto espinotalámico contralateral. La lámina II contiene células pequeñas empaquetadas que corresponden a la sustancia gelatinosa. Los cuerpos celulares asociados

con el dolor (y donde existe SP), se localizan en la zona externa de la lámina II. También existe SP en el núcleo espinal del trigémino, localizándose en las zonas de dicho núcleo relacionadas con el dolor y los estímulos nociceptivos, es decir, en la lámina I y parte de la lámina II de la pars caudalis (**CARPENTER, 1991**).

Además, la administración de SP a este núcleo, ha demostrado que sólo se excitan las neuronas relacionadas con el dolor, y no las neuronas de la pars oralis interpolaris ni las láminas III y IV de la pars caudalis. La lesión del ganglio del trigémino o rizotomía, origina una deplección de SP en el núcleo espinal del trigémino ipsilateral (**CUELLO, DEL FIACCO y PAXINOS, 1978**).

También en la sustancia gris periacueductal del cerebro medio, fundamentalmente en las regiones ventrolaterales que son las relacionadas con la analgesia, existe SP que sugiere que este péptido está implicado en los mecanismos centrales analgésicos (**CHIGR ET AL, 1991**).

Estudios realizados con capsaicina, sustancia que origina una degeneración selectiva y permanente de las neuronas sensitivas primarias de pequeño diámetro, han demostrado que su administración a ratas origina una dramática pérdida (80 a 95%) de la SP-IR en la sustancia gelatinosa (lámina II) y capa marginal de la médula espinal y núcleo espinal del trigémino al igual que en las estructuras periféricas como nervios de la raíz dorsal, safeno y vago así como en la piel (**GAMSE ET AL, 1981; PERNOW, 1983; BUCK Y BURKS, 1986**).

STEWART ET AL (1976) demostraron que SP dada intracerebroventricular o intraperitoneal, origina analgesia de larga duración y 25 veces más potente que la morfina. Pequeñas dosis de SP producen liberación de péptidos opioides mientras que dosis mayores estimulan la actividad neuronal en las vías nociceptivas.

Por otro lado, SP interactúa con otros sistemas peptidérgicos implicados en la nocicepción. La interacción más importante se realiza entre SP y los péptidos opioides. En zonas tales como la sustancia gris periacueductal, núcleo del rafe magnus, capas I y II del núcleo espinal del trigémino y en todas las partes de la médula, existe coexistencia de terminales nerviosos que contienen Met-enkefalina y SP. Estos péptidos probablemente interactúan a nivel postsináptico en la modulación del dolor. Además en las neuronas sensitivas, existe también, además de SP, somatostatina, VIP, gastrina/Colecistoquinina y angiotensina II (en los aferentes primarios del asta dorsal de la médula espinal y los ganglios simpáticos) aunque con distinta disposición: SP y gastrina/Colecistoquinina presentan distribución semejante mientras que somatostatina se localiza en estratos más profundos (**PERNOW, 1983; LUNDBERG ET AL, 1985a**).

V) NEUROPEPTIDO Y (NPY).

V.a.- CARACTERISTICAS.

El **NEUROPEPTIDO Y (NPY)** fue aislado por primera vez en 1.982 por **TATEMOTO, CARLQUIST Y MUTT (1982)** del cerebro porcino. El término Neuropéptido Y (Y = TIROSINA en la nomenclatura para aminoácidos) se debe a que en su estructura molecular, compuesta de 36 aminoácidos, contiene una gran proporción de grupos tirosina (5 grupos), incluyendo un residuo tirosina en posición N-terminal y una tirosina-amida en posición C-terminal.

NPY pertenece a la familia del Polipéptido Pancreático (PP), y comparte una región común C-terminal con el Péptido Intestinal YY (PYY) (**TATEMOTO, CARLQUIST Y MUTT, 1982; TATEMOTO, 1982**). Presenta una estructura muy similar al PP bovino (17 aminoácidos en común) y al PP de ave (20 aminoácidos en común).

La secuencia del NPY es muy semejante en las distintas especies. La secuencia de aminoácidos en el hombre y la rata es idéntica y sólo difiere del NPY bovino en un aminoácido (Metionina en posición 17 es sustituido por leucina) (**PERNOW, 1988**).

A diferencia de los neurotransmisores clásicos, cuyo lugar predominante de síntesis es el terminal nervioso, NPY se sintetiza en los ribosomas del cuerpo celular nervioso (HÖKFELT ET AL, 1980; FRIED ET AL, 1985). Se ha aislado el RNAm que codifica el NPY humano cuyo precursor presenta 97 aminoácidos (MINTH ET AL, 1984). Tras su procesamiento postranslacional, se empaqueta en vesículas y alcanza el terminal nervioso por transporte axonal desde donde será liberado (FRIED ET AL, 1985; LUNDBERG ET AL, 1989).

NPY se almacena en vesículas grandes de núcleo denso (Nor se almacena tanto en vesículas grandes como pequeñas y como veremos después, parece que NPY coexiste con Nor en algunas terminaciones nerviosas). Una estimulación de baja frecuencia libera sólo Nor (vesículas pequeñas) mientras que la estimulación de alta frecuencia libera las dos sustancias. Es decir, la cantidad de NPY liberado depende del patrón y de la frecuencia de estimulación simpática (EDVINSSON ET AL, 1987).

- **RECEPTORES PARA NPY**: Las acciones de NPY parecen ser el resultado de la estimulación de receptores específicos. Así, el efecto vasoconstrictor de NPY en el corazón se debería a la estimulación de receptores localizados probablemente en las células musculares lisas de los vasos coronarios, ya que existe vasoconstricción con concentraciones muy bajas de este péptido (RIOUX ET AL, 1986; BALASUBRAMANIAM ET AL, 1990a).

BALASUBRAMANIAM ET AL (1990b) han estudiado los receptores para NPY en la membrana ventricular cardíaca de la rata, comprobando que estos receptores son heterogéneos, compuestos de lugares de alta y baja afinidad (denominados Y1 e Y2) y unidos al sistema adenilato ciclasa (**SHIGERI Y FUJIMOTO, 1994**).

Además, los receptores para NPY son muy sensibles a pequeños cambios introducidos en la molécula original. Cuando se estudian separadamente los fragmentos C-terminales de NPY (NPY (16-36) y NPY (19-36)), se observa que los grupos químicos responsables de la actividad vasoconstrictora de NPY en los vasos coronarios del cobaya se encuentran en el fragmento C-terminal de NPY, mientras que los responsables de la afinidad (o potencia) de NPY para los receptores, se podrían localizar en el fragmento N-terminal (**RIOUX ET AL, 1986; BALASUBRAMANIAM ET AL, 1990a**).

V.b.- DISTRIBUCION DE NPY EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

NPY es el péptido más abundante en el cerebro de los mamíferos (**CHRONWALL, CHASE Y O'DONOHUE, 1984; EVERITT ET AL, 1984; GU ET AL, 1984; ALLEN Y BLOOM, 1986; EDVINSSON ET AL, 1987**).

NPY presenta una amplia distribución a todo lo largo del SNC, existiendo en concentración particularmente abundante en los ganglios basales, amígdala y núcleo accumbens. Altos niveles se han demostrado en sistema límbico y regiones hipotalámicas y en los núcleos centrales del tronco cerebral que se sabe que afectan la función autonómica visceral. El cerebelo no posee cuerpos celulares ni fibras nerviosas NPY-IR. La distribución es como sigue:

V.b.1.- TELENCEFALO.

Cuerpos celulares NPY-IR se han descrito en la corteza cerebral y fundamentalmente en el núcleo caudadoptamen, núcleo accumbens, núcleo de la estría terminal y amígdala. Fibras y terminales nerviosos NPY-IR en gran cantidad también se describen en el núcleo amigdalino central, relacionados con el núcleo accumbens, dentro del haz medial del cerebro anterior y en el núcleo de la estría terminal (EVERITT ET AL, 1984; MUTT ET AL, 1989).

V.b.2.- DIENCEFALO.

En el HIPOTALAMO se observa una alta densidad de cuerpos celulares y fibras nerviosas NPY-IR en los núcleos posterior, dorsomedial e infundibular y moderada en los núcleos supraóptico y paraventricular (EVERITT ET AL, 1984; GU ET AL, 1984; CIARLEGLIO, BEINFELD Y WESTFALL, 1993).

V.b.3.- MESENCEFALO.

Normalmente no se observan cuerpos celulares NPY-IR en la región de las neuronas dopaminérgicas mesencefálicas demostrándose células aisladas en la zona más ventral de la zona compacta medial. Fibras nerviosas NPY-IR se hallan en bajo a moderado número en el área tegmentaria ventral y sólo fibras aisladas en la zona compacta de la sustancia negra (EDVINSSON ET AL, 1987).

V.b.4.- ROMBENCEFALO.

En el rombencéfalo, la densidad más alta de material NPY-IR se localiza en la parte dorsal del locus ceruleus (CHRONWALL ET AL, 1984; ALLEN Y BLOOM, 1986; MUTT ET AL, 1989).

Numerosas fibras NPY-IR también se describen en el rafe dorsal, y especialmente en el núcleo del tracto solitario y en el núcleo trigeminal espinal (EVERITT ET AL, 1984; MUTT ET AL, 1989).

V.b.5.- MEDULA ESPINAL.

Cuerpos celulares y fibras NPY-IR se localizan fundamentalmente en el asta dorsal de la médula espinal. Los cuerpos celulares parecen corresponder a neuronas intrínsecas (EVERITT ET AL, 1984; GU ET AL, 1984). Las terminaciones nerviosas

NPY-IR se localizan particularmente en la sustancia gelatinosa (capa II) del asta dorsal de la médula espinal. Estas fibras se originan probablemente de vías descendentes y de neuronas espinales intrínsecas y se piensa que NPY está ausente en las neuronas sensitivas primarias (EVERITT ET AL, 1984; GU ET AL, 1984; DOYLE Y MAXWELL, 1993).

V.c.- DISTRIBUCION VISCERAL DE NPY.

Aunque aislado por vez primera del cerebro, NPY tiene también una amplia distribución en el Sistema Nervioso Periférico autonómico de diversas visceras aunque no exclusivamente en las fibras nerviosas postgangliónicas simpáticas (LUNDBERG ET AL, 1983).

V.c.1.- GANGLIOS SIMPATICOS.

LUNDBERG ET AL (1983) demostraron concentraciones elevadas de NPY en tejidos que reciben inervación simpática en diversas especies: cobaya, gato, cerdo y hombre. Los niveles más elevados de NPY se observaron en el ganglio estrellado del cobaya y en el ganglio mesentérico superior del cerdo. También existen altas concentraciones de este péptido en los ganglios cervical superior y celíaco de la rata (LUNDBERG ET AL, 1982; EKBLAD ET AL, 1984).

V.c.2.- APARATO GASTROINTESTINAL.

NPY se distribuye en numerosas fibras nerviosas que inervan el músculo liso circular del esófago, estómago y duodeno, siendo su cantidad menor en el colon. Los dos plexos ganglionares (submucoso y mientérico) poseen abundantes cuerpos celulares y fibras nerviosas NPY-IR (LUNDBERG ET AL, 1983).

También existen numerosas fibras nerviosas que contienen NPY alrededor de los vasos de la pared intestinal, sobre todo en las arterias y arteriolas de la serosa y submucosa. Las pequeñas venas de la pared intestinal y el mesenterio están escasamente inervadas (LUNDBERG ET AL, 1983; UDDMAN ET AL, 1985).

- **HIGADO:** Existen plexos de fibras nerviosas NPY-IR alrededor de la vena porta y las arterias hepáticas principales. En el parénquima, las fibras se distribuyen alrededor de las pequeñas ramas de la arteria hepática y alrededor de las venas centrales. No existen fibras con NPY en las venas interlobulares (UDDMAN ET AL, 1985).

- **PANCREAS:** Se observan fibras nerviosas NPY-IR alrededor de los vasos pancreáticos y formando plexos en torno a las células ganglionares. Nervios aislados NPY-IR se han demostrado dentro del parénquima endocrino de los islotes de Langerhans (LUNDBERG ET AL, 1983).

- **BAZO:** Aparecen muchas fibras NPY-IR alrededor de la arteria esplénica y, dentro de la pulpa esplénica, en torno a los pequeños vasos (capilares). En la vena esplénica, las fibras son muy escasas (ALLEN ET AL, 1985a; UDDMAN ET AL, 1985).

V.c.3.- APARATO RESPIRATORIO.

Varicosidades NPY-IR se pueden observar en el músculo liso traqueobronquial y en los ganglios bronquiales (LUNDBERG ET AL, 1983). Numerosas fibras nerviosas NPY-IR perivasculares se describen en la mucosa nasal y en la pared traqueal. Las fibras rodean arterias de mediano y gran tamaño. Así, las arterias pulmonares principales reciben muchas fibras NPY-IR pero están ausentes en los vasos de la periferia del pulmón (UDDMAN ET AL, 1985).

V.c.4.- APARATO CARDIOVASCULAR.

A) CORAZON:

Se ha demostrado una alta densidad de inervación por NPY en el corazón de ratón, rata (GU ET AL, 1984; ALLEN ET AL, 1985a; CORR ET AL, 1990; PRADOS FRUTOS ET AL, 1992; PRADOS FRUTOS, MARTIN PEREZ Y PUERTA FONOLLA, 1993), cobaya (HASSALL Y BURNSTOCK, 1984; STERNINI Y BRECHA, 1985; UDDMAN ET AL, 1985; DALSGAARD ET AL, 1986; MORRIS ET AL, 1986) y humano (GU ET AL, 1983; PURJERANTA ET AL, 1986;

GULBENKIAN ET AL, 1993). Numerosas fibras NPY-IR inervan el miocardio auricular y ventricular, los nodos SA y AV, las arterias coronarias y las válvulas cardíacas. La mayor densidad de inervación se localiza en el miocardio auricular, tejido de conducción y vasos coronarios. (**LUNDBERG ET AL, 1983; GU ET AL, 1983; 1984; UDDMAN ET AL, 1985; DALSGAARD ET AL, 1986; WARNER Y LEVY, 1990b; CORR ET AL, 1990; PRADOS FRUTOS ET AL, 1992; GULBENKIAN ET AL, 1993).** Las arterias coronarias, fundamentalmente a nivel de la adventicia o en la unión adventicia-media, poseen un compacto plexo de nervios NPY-IR (**GU ET AL, 1984; UDDMAN ET AL, 1985; PRADOS FRUTOS, MARTIN PEREZ Y PUERTA FONOLLA, 1993; GULBENKIAN ET AL, 1993).**

Se han demostrado neuronas ganglionares intrínsecas NPY-IR en el corazón de la rata, ratón y cobaya: algunas parecen ser noradrenérgicas (**GU ET AL, 1984; DALSGAARD ET AL, 1986**), y otras no noradrenérgicas (**DALSGAARD ET AL, 1986; HASSALL Y BURNSTOCK, 1987**). Sin embargo, la mayoría de la inmunorreactividad para NPY en el corazón de los mamíferos está presente en los terminales de las neuronas noradrenérgicas (**LUNDBERG ET AL, 1983; ALLEN ET AL, 1985a; MORRIS ET AL, 1986**) cuyos cuerpos celulares se localizan en los ganglios simpáticos (**DALSGAARD ET AL, 1986**).

B) VASOS:

NPY está ampliamente distribuido en los nervios perivasculares de vasos periféricos y cerebrales de diversas especies (**UDDMAN ET AL, 1985; LUNDBERG**

ET AL, 1982b; EKBLAD ET AL, 1984; ALLEN ET AL, 1985a; UDDMAN ET AL, 1985; PERNOW, 1988).

Las arterias están, por lo general, más densamente inervadas que las venas correspondientes (**EDVINSSON ET AL, 1987; PERNOW, 1988**). Se ha demostrado la existencia de NPY en la adventicia de la mayoría de las grandes arterias, sobre todo, en las arterias cerebrales (polígono de Willis), renales, mesentérica superior y aorta torácica. Por el contrario, las arterias femorales, subclavia y carótidas están inervados por escasas fibras NPY-IR (**LUNDBERG ET AL, 1983; EKBLAD ET AL, 1984; UDDMAN ET AL, 1985; KAWAMURA, SAKATA Y TAKEBAYASHI, 1991**).

V.c.5.- APARATO GENITOURINARIO.

Se han demostrado abundantes fibras nerviosas NPY-IR en el músculo liso del uréter (sobre todo en la unión uretero-vesical), vejiga urinaria (fundamentalmente en el triángulo), uretra, vagina, útero (cervix y cuerpo), trompas, ovario, próstata y conducto deferente, así como alrededor de los vasos, tanto arteriolas como vénulas (**LUNDBERG ET AL, 1983; PRIETO ET AL, 1989; MULSHOF ET AL, 1994**).

En cuanto a los vasos renales, la arteria renal tiene una inervación moderadamente densa por fibras NPY-IR. En el parénquima renal, los nervios NPY-IR forman un plexo

perivascular en el árbol arterial y tercio proximal de las venas interlobares, innervando también el cáliz renal (KNIGHT, FABRE Y BEAL, 1989).

Respecto a la innervación del tracto genital, existen numerosas fibras nerviosas NPY-IR en las arterias de mediano y gran tamaño del cérvix uterino, arteria uterina mayor, ovárica, testicular y los pequeños vasos relacionados con el conducto deferente y las vesículas seminales. La densidad de innervación decrece en las ramificaciones vasculares periféricas (UDDMAN ET AL, 1985).

V.d.- COEXISTENCIA DE NPY CON OTRAS SUSTANCIAS NEUROACTIVAS.

V.d.1.- NPY Y CATECOLAMINAS.

Los diversos estudios inmunohistoquímicos han demostrado la coexistencia de NPY y Nor en una población de neuronas simpáticas (LUNDBERG ET AL, 1983; EKBLAD ET AL, 1984; PERNOW, 1988; WARNER Y LEVY, 1990b; CIARLEGLIO, BEINFELD Y WESTFALL, 1993) y en ciertas neuronas del tronco cerebral que parecen estar implicadas en el control del sistema cardiovascular (EVERITT ET AL, 1984; CIARLEGLIO, BEINFELD Y WESTFALL, 1993). En los nervios de la adventicia de las arterias principales se han demostrado altas concentraciones de NPY posiblemente asociadas con el sistema noradrenérgico, por lo que se puede admitir que

el músculo vascular arterial está sometido a un control neural vasoconstrictor dual mediante un neurotransmisor clásico, la Noradrenalina, y un neuropéptido, NPY (ALLEN ET AL, 1985a).

Para demostrar la naturaleza simpática, de las fibras NPY-IR perivasculares, se han realizado diversos estudios. La extirpación unilateral del ganglio cervical superior origina la desaparición de las fibras NPY-IR perivasculares del lado denervado (tiroides, iris y mucosa nasal). La simpatectomía química (con 6-hidroxidopamina) disminuye la concentración de Nor en más del 80% y casi la totalidad de NPY en todo el sistema vascular (PORTER, TOTARO Y STONE, 1963; THOENEN Y TRANZER, 1968; KOSTRZEWA Y JACOBOWITZ, 1974; LUNDBERG ET AL, 1982; LUNDBERG ET AL, 1985b; UDDMAN ET AL, 1985; MABE ET AL, 1987).

Pero no todas las neuronas que contienen NPY son de origen simpático. En el cerebro, EVERITT ET AL (1984) encontraron que NPY está localizado en los cuerpos celulares noradrenérgicos (A1)/adrenérgicos (C1) del bulbo raquídeo ventrolateral, los cuerpos celulares noradrenérgicos de A6 (locus ceruleus) y los cuerpos celulares adrenérgicos de los grupos C2. Por el contrario, no se observa NPY en los cuerpos celulares noradrenérgicos de A2, A5, grupo subceruleus y A7 de la protuberancia ni en los cuerpos celulares dopaminérgicos (A8-A15) del mesencéfalo y telencéfalo. También en el corazón, MACCARRONE Y JARROT (1987), CORR ET AL (1990), ABERDEEN ET AL (1992), GORDON ET AL (1993) han demostrado que

aproximadamente el 50% del contenido de NPY cardíaco se origina de nervios simpáticos mientras que el resto es probable que esté contenido en neuronas intrínsecas.

V.d.2.- NPY Y SOMATOSTATINA.

Se ha demostrado la coexistencia de NPY y somatostatina en las mismas neuronas de la corteza cerebral humana y de la rata, así como en el núcleo arcuato del hipotálamo de la rata (CHRONWALL, CHASE Y O'DONOHUE, 1984; ALLEN Y BLOOM, 1986). En la corteza cerebral, existen más cuerpos celulares con Somatostatina que con NPY pero más fibras NPY-IR. Los cuerpos celulares que contienen los dos péptidos (NPY y Somatostatina) se localizan principalmente en las capas II/III y VI. En el hipotálamo, la distribución de cuerpos celulares que contienen los dos péptidos es similar (CHRONWALL, CHASE Y O'DONOHUE, 1984).

No obstante, aunque parece que estas dos sustancias coexisten en ciertas neuronas, parece ser que estos dos sistemas neuronales son independientes: En la demencia tipo Alzheimer hay una deplección de Somatostatina cortical mientras que la concentración de NPY permanece intacta o incluso se eleva (LYNCH Y SNYDER, 1986).

V.d.3.- NPY Y OTROS PEPTIDOS.

También se ha observado coexistencia de NPY con otros péptidos como VIP, GABA y Galanina entre otros e incluso coexistencia múltiple (NPY, Somatostatina,

Colecistoquinina y Acetilcolina en una misma población de neuronas (FURNESS ET AL, 1984; ZHU Y DEY, 1992).

V.e.- ACCIONES FARMACOLOGICAS DE NPY.

V.e.1.- NPY EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

La amplia distribución de NPY en el SNC sugiere la participación de este péptido en diversas funciones reguladoras:

a) **En el tronco cerebral:** La inyección intraventricular de NPY origina hipotensión, bradipnea y bradicardia (FUXE ET AL, 1983).

b) **En el hipotálamo:** La aplicación de NPY en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas, aumenta la ingesta fundamentalmente para los hidratos de carbono y estimula el mecanismo de la sed (ALLEN Y BLOOM, 1986; CIARLEGLIO, BEINFELD Y WESTFALL, 1993).

c) **En la adenohipófisis:** NPY influye en la secreción de hormonas de la adenohipófisis. A dosis bajas, inhibe la liberación de Hormona Luteinizante (LH) mientras que a dosis 100 veces mayor inhibe la liberación de Hormona del crecimiento (ALLEN Y BLOOM, 1986).

d) **En la médula espinal:** Los axones que contienen NPY en la lámina II de la médula espinal pueden regular la transmisión sensitiva espinal a través tanto de una acción postsináptica sobre las neuronas del asta dorsal como de una acción presináptica sobre los terminales aferentes primarios, muchos de los cuales contienen SP (DOYLE Y MAXWELL, 1993).

V.e.2.- **ACCIONES VISCERALES DE NPY.**

NPY ejerce diversas acciones sobre la respuesta vascular simpática y del músculo liso, encontrándose entre los péptidos VASOCONSTRICTORES más potentes aislados hasta la fecha (FRANCO-CERECEDA Y LUNDBERG, 1982; LUNDBERG Y TATEMOTO, 1982; ALLEN ET AL, 1985b; FRANCO-CERECEDA ET AL, 1985; WARNER Y LEVY, 1990a; WHARTON Y POLAK, 1990a).

- **EFEECTO VASOCONSTRUCTOR:**

La administración sistémica intravenosa de NPY induce hipertensión arterial sistémica por aumento de la resistencia periférica total. Esta acción vasoconstrictora es resistente al bloqueo de los receptores alfa-adrenérgicos y está presente en animales simpatectomizados (LUNDBERG ET AL, 1982; LUNDBERG Y TATEMOTO, 1982; POTTER, 1985; EDVINSSON ET AL, 1987).

La administración intraarterial de NPY origina una vasoconstricción local de desarrollo lento y larga duración en la arteria y glándula submandibulares del gato (LUNDBERG ET AL, 1982; LUNDBERG Y TATEMOTO, 1982).

La infusión directa de NPY en las arterias coronarias origina vasoconstricción coronaria y disminución del volumen de perfusión del corazón (descenso del flujo coronario) (FRANCO-CERECEDA ET AL, 1989; WARNER Y LEVY, 1990a).

- EFECTOS SOBRE LA CONTRACTILIDAD CARDIACA:

Aunque NPY origina siempre vasoconstricción coronaria, sus efectos sobre la contractilidad cardíaca varían encontrándose efectos intrópicos negativos (ALLEN ET AL, 1983; FRANCO-CERECEDA, LUNDBERG Y DAHLOF, 1985; RIOUX ET AL, 1986; BALASUBRAMANIAM ET AL, 1988; RIGEL ET AL, 1989); efectos inotrópicos positivos (LUNDBERG, HUA Y FRANCO-CERECEDA, 1984) o incluso ausencia de alteración de la fuerza contráctil (ALLEN ET AL, 1986; MICHEL ET AL, 1989) dependiendo de la especie animal y de la preparación empleada en el estudio.

- EFECTOS SOBRE LA FRECUENCIA CARDIACA:

Igualmente, se ha demostrado que NPY tiene efectos variables sobre la frecuencia cardíaca dependiendo de la especie animal. Así, es cronotrópico positivo en aurícula aislada de cobaya (LUNDBERG, HUA Y FRANCO-CERECEDA, 1984; FRANCO-CERECEDA, LUNDBERG Y DAHLOF, 1985), posee un efecto cronotrópico negativo en corazones aislados de rata (ALLEN ET AL, 1983; RIOUX ET AL, 1986;

BALASUBRAMANIAM ET AL, 1988) y no tiene efecto directo sobre la frecuencia cardíaca o el tiempo de conducción del nodo AV in vivo en perros (**ALLEN ET AL, 1986; RIGEL, 1988; RIGEL ET AL, 1989; WARNER Y LEVY, 1989a,b**).

Se ha postulado que NPY puede participar en la patofisiología de la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC). Este cuadro conduce a una activación del SNs con aumento en la liberación de Nor del miocardio (**DUBOIS-RANDE ET AL, 1992**). Puesto que NPY se almacena y libera con Nor de las terminaciones nerviosas simpáticas, **ULLMAN ET AL (1993)** estudiaron pacientes con ICC crónica leve a moderada con el fin de determinar si existe alguna correlación entre los niveles plasmáticos de NPY, Nor y la función del VI. Observaron que los niveles de NPY plasmáticos poseen una mejor correlación con la función del VI y parece ser un mejor marcador de la ICC leve a moderada que la Nor, pudiéndose considerar como factor pronóstico en estos pacientes. También se han encontrado niveles elevados de NPY en pacientes con isquemia miocárdica aguda (**ULLMAN ET AL, 1993**) y fallo ventricular izquierdo agudo (**MAISEL ET AL, 1989**). Es posible que la liberación de NPY durante la ICC severa pueda contribuir al deterioro de la función del VI.

- EFECTOS RENALES:

NPY es un potente vasoconstrictor de la vascularización renal asociándose a natriuresis secundaria probablemente a la isquemia (por disminución de la perfusión renal) y vasoconstricción arteriolar periférica renal que aumenta la presión de filtración relativa (**ALLEN ET AL, 1985b**).

- **SOBRE LA CIRCULACION CEREBRAL:**

En los vasos cerebrales, NPY origina vasoconstricción prolongada in vivo e in vitro con la isquemia cerebral asociada (EDVINSSON ET AL, 1987).

VI) PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP).

VI.a.- CARACTERISTICAS.

El PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP) se aisló por primera vez del intestino delgado del cerdo por SAID Y MUTT (1970). El VIP porcino es un péptido básico de 28 aminoácidos íntimamente relacionado con la secretina y similar también al glucagón, al péptido inhibidor gástrico, al péptido porcino histidina-isoleucina (PHI) y al recientemente descubierto factor liberador de hormona de crecimiento (GHRF) (ROSTÈNE, 1984; BESSON ET AL, 1986). Su estructura es:

**His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-
Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn-NH₂.**

Desde su aislamiento en el intestino porcino, se han aislado péptidos de secuencia idéntica en intestino bovino (CARLQUIST, MUTT Y JORWALL, 1979), de la rata (DIMALINE ET AL, 1984) y en el colon humano (CARLQUIST ET AL, 1982) por lo que parece evidente que VIP procedente de mamíferos presenta una estructura constante característica. En el intestino del pollo, VIP difiere del octacosapéptido porcino en sólo cuatro aminoácidos (NILSSON, 1975).

No está del todo claro qué regiones de la secuencia de VIP son esenciales en su actividad biológica, pero la similitud estructural observada entre los distintos mamíferos sugiere que la integridad de toda la secuencia del octacosapéptido es requerida para la expresión completa de su actividad como neuropéptido (**ROSTÈNE, 1984; DIMALINE ET AL, 1984**).

En 1976, seis años después de su descubrimiento en el intestino, se demostró la existencia de VIP en líneas celulares de neuroblastoma y astrocitoma y en tejido cerebral del perro sugiriendo la existencia de este péptido tanto en el SNC como en el periférico (**SAID Y ROSENBERG, 1976**).

Al igual que los otros neuropéptidos, VIP se sintetiza en los ribosomas del cuerpo neuronal como "precursor" o "preproteína". La preproVIP contiene 170 aminoácidos (**ROSTÈNE, 1984**). En el axón, VIP se localiza principalmente en el aparato de Golgi, los microtúbulos y en las vesículas grandes de núcleo denso. Tras su procesamiento, VIP contiene 28 aminoácidos y llegará al terminal nervioso por transporte axonal preparado para su liberación.

Desde las terminaciones nerviosas, VIP se libera en respuesta a diversos estímulos:

- **In vivo**: VIP se libera de la médula espinal del gato y de la rata en respuesta al potasio o a la estimulación eléctrica del nervio ciático (**YAKSH, ABAY Y GO, 1982**)

y en el líquido cefalorraquídeo humano en respuesta a drogas colinérgicas (**EBEID ET AL, 1979**).

- **In vitro**: VIP se libera de las terminaciones nerviosas de la corteza cerebral, hipotálamo, amígdala y estriado en respuesta a diversos agentes despolarizantes (**BESSON ET AL, 1982**).

VIP es inactivado rápidamente en los diversos tejidos por degradación enzimática (**ROSTÈNE, 1984**).

- **RECEPTORES PARA VIP**: Se han demostrado receptores de alta y baja afinidad para VIP en diversas regiones del SNC y periférico (**BESSON ET AL, 1986; BRUM ET AL, 1986; HUANG Y RORSTAD, 1987; MAGISTRETTI ET AL, 1988; AMENTA ET AL, 1989**). El efecto vasodilatador de VIP se lleva a cabo mediante una relajación directa del músculo liso vascular, es independiente del endotelio y se asocia a una estimulación de la adenilato ciclasa (**BRUM ET AL, 1986; BESSON ET AL, 1986; HUANG Y RORSTAD, 1987; CALVO ET AL, 1994**).

Además, tanto en SNC como periférico, se ha demostrado que es necesaria la secuencia completa de la molécula de VIP para unirse al receptor e inducir la acción fisiológica completa ya que la sustitución o delección de alguno de sus aminoácidos reduce su actividad biológica (**BESSON ET AL, 1986; HUANG Y RORSTAD, 1987**).

VI.b.- DISTRIBUCION DE VIP EN EL SNC.

A partir de la purificación de anticuerpos monoclonales para VIP, este péptido ha sido identificado mediante técnicas inmunohistoquímicas y radioinmunológicas en diversas regiones del SNC. Estudios autorradiográficos de localización de receptores han ayudado también a la caracterización y al conocimiento de su distribución en el SNC (DE SOUZA, SEIFERT Y KUCHAR, 1985; BESSON ET AL, 1986).

Las concentraciones más elevadas de VIP se encuentran en la corteza cerebral, amígdala, hipocampo e hipotálamo. También se ha demostrado la existencia de VIP en retina, tronco cerebral y en el asta dorsal de la médula espinal de diversas especies (SAID Y ROSENBERG, 1976; ROSTÈNE, 1984; DE SOUZA, SEIFERT Y KUCHAR, 1985).

VI.b.1.- TELENCEFALO.

En todas las regiones de la corteza cerebral existen neuronas VIP-Inmunorreactivas (VIP-IR) (ROSTENE, 1984; MAGISTRETTI ET AL, 1988). En la rata, las neuronas VIP-positivas representan aproximadamente el 1% de las neuronas corticales con distribución uniforme en todas las áreas corticales (DE SOUZA, SEIFERT Y KUCHAR, 1985).

En los ganglios basales, la densidad de material VIP-IR es moderada en el núcleo accumbens, baja en el caudado putamen y muy baja en el globus pallidum (DE SOUZA, SEIFERT Y KUCHAR, 1985; BESSON ET AL, 1986).

VI.b.2.- AMIGDALA.

Se han observado cuerpos celulares y fibras nerviosas VIP-IR en la mayoría de los núcleos de la amígdala, principalmente en los núcleos lateral y laterobasal. Estudios autorradiográficos han demostrado una alta concentración de receptores para VIP en el núcleo central (BESSON ET AL, 1986).

VI.b.3.- HIPOTALAMO.

Se puede demostrar un gradiente de concentración descendente de VIP desde las regiones anteriores a las posteriores del hipotálamo. Los niveles más altos de VIP en el hipotálamo anterior se deben principalmente a una importante concentración del mismo en los núcleos supraquiasmático y dorsomedial. Concentraciones más bajas se encuentran en los núcleos arcuato, mamilar y periventricular (ROSTENE, 1984; BESSON ET AL, 1986).

VI.b.4.- HIPOCAMPO.

Presenta una concentración de VIP entre moderada-alta en el subiculum y en diferentes áreas del asta de Ammon y también en la capa granular del gyrus dentado dorsal y ventral (**BESSON ET AL, 1986**).

En dirección caudal, existen bajas concentraciones de VIP, con excepción de la capa superficial de la sustancia gris central del cerebro medio, núcleo del rafe dorsal, locus ceruleus, núcleo parabraquial y núcleo del tracto solitario (**ROSTENE, 1984; BESSON ET AL, 1986**).

La presencia de neuronas intrínsecas con VIP en el núcleo del tracto solitario, el centro barorreceptor primario, es importante en cuanto al papel que desempeña VIP en la regulación del flujo sanguíneo (**ROSTENE, 1984**).

VI.c.- DISTRIBUCION VISCERAL DE VIP.

Además de la localización en el SNC, las fibras nerviosas VIP-IR se localizan también en el sistema nervioso de distintos órganos periféricos, particularmente en los aparatos cardiovascular, respiratorio, gastrointestinal y genitourinario:

VI.c.1.- NEURONAS SENSITIVAS Y SIMPATICAS.

Se han observado fibras nerviosas VIP-IR en el asta dorsal de la médula espinal y en una población menor de cuerpos celulares nerviosos de los ganglios de la raíz dorsal en los niveles sacro y lumbar. También se ha demostrado en ganglios simpáticos (ganglio cervical superior, ganglio estrellado y ganglios simpáticos torácicos y lumbares) (SUNDLER ET AL, 1988).

VI.c.2.- APARATO GASTROINTESTINAL.

VIP es uno de los neuropéptidos más abundantes en el tracto gastrointestinal. Numerosas fibras nerviosas VIP-IR se han observado en todas las capas de la pared intestinal en diversas especies (cerdo, gato, rata, ratón y hombre) (LARSSON ET AL, 1976; SUNDLER ET AL, 1988; TSUTSUMI Y HARA, 1989). Las neuronas VIP-érgicas se originan principalmente del plexo submucoso y se extienden a todas las capas, incluyendo la mucosa y la capa muscular circular. La capa muscular longitudinal sólo recibe inervación del plexo mientérico (MANNON Y TAYLOR, 1992). La distribución de fibras nerviosas VIP-IR en el tracto gastrointestinal varía en las distintas especies. Como ejemplo, en la mucosa gástrica de la rata son relativamente escasas pero abundantes en el hombre (LARSSON ET AL, 1976; TSUTSUMI Y HARA, 1989).

- En el ESOFAGO, todas las capas están inervadas por fibras nerviosas que contienen VIP, fundamentalmente en la muscularis mucosa (WATTCHOW ET AL, 1987).

- En ESTOMAGO, el antro tiene menor inervación que el fundus gástrico. En el hombre, la inervación es muy densa en todas las capas: mucosa, muscularis mucosa, submucosa (alrededor de los vasos) y muscular propia (entre las células musculares lisas). El píloro está densamente inervado por VIP (TSUTSUMI Y HARA, 1989; MANNON Y TAYLOR, 1992).

- En el INTESTINO DELGADO, la concentración de VIP es mucho mayor en la capa muscular que en la mucosa. En la mucosa duodenal existen menos fibras con VIP que con SP. En la muscularis mucosa, VIP se distribuye en los vasos submucosos y en las glándulas de Brunner (GREENWOOD ET AL, 1990).

- En COLON, existen fibras VIP-IR en la mucosa (formando una red alrededor de las cripts y en los villi), en la submucosa y en las capas musculares circular y longitudinal (DOMOTO ET AL, 1990).

La vagotomía quirúrgica o la simpatectomía química no producen ningún cambio en el número o distribución de las fibras nerviosas VIP-IR por lo que este sistema de fibras nerviosas parece ser intrínseco de la pared intestinal (LARSSON ET AL, 1976; SUNDLER ET AL, 1988).

- En el **PANCREAS**, existen pocas fibras nerviosas VIP-IR, apareciendo en el tejido conectivo que separa los lóbulos pancreáticos y se ven sólo ocasionalmente entre los acini o en los islotes (SUNDLER ET AL, 1988).

VI.c.3.- APARATO RESPIRATORIO.

Las vías aéreas están densamente inervadas por el neuropéptido VIP. Las fibras que contienen VIP se distribuyen en el epitelio, lámina propia y en asociación con los haces musculares, vasos sanguíneos y glándulas. Son intensamente inmunorreactivos en la mucosa nasal, tráquea (tanto proximal como distal) y bronquios principales. En el pulmón, son escasas pudiéndose demostrar en los septos y asociados a los vasos. Se han observado cuerpos celulares nerviosos que contienen VIP en los pequeños ganglios localizados sobre la superficie externa o dorsal de la pared traqueal (SUNDLER ET AL, 1988; LUTS Y SUNDLER, 1989; ALBEGGER ET AL, 1991).

VI.c.4.- APARATO CARDIOVASCULAR.

A) CORAZON:

VIP está ampliamente distribuido en el corazón. Se han demostrado fibras VIP-IR relacionadas con las arterias coronarias, en las aurículas, en los nodos SA y AV y cuerpos celulares en los ganglios cardíacos localizados en aurícula izquierda, origen de la aorta ascendente y tronco pulmonar, regiones del surco coronario y en los nodos SA y AV. En el miocardio ventricular, existen muy pocas fibras VIP-IR (DELLA ET AL,

1983; REINECKE Y FORSSMANN, 1984; WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984; BRUM ET AL, 1986; GERSTHEIMER ET AL, 1988; FORSGREN, 1989c; HOOVER, 1989; ANDERSON ET AL, 1992; PRADOS FRUTOS ET AL, 1992; ZHU Y DEY, 1992; GULBENKIAN ET AL, 1993; PRADOS FRUTOS, MARTIN PEREZ Y PUERTA FONOLLA, 1993).

B) VASOS:

La distribución de la innervación VIP-érgica en el sistema vascular varía según las zonas. Mientras que la gran parte de los grandes vasos reciben una innervación escasa o moderada, en diversos lechos vasculares regionales ésta es muy densa: las arterias que reciben mayor innervación por fibras nerviosas VIP-IR son las que corresponden al intestino, cerebro y aparato genitourinario (DELLA ET AL, 1983; SUNDLER ET AL, 1988).

a) Arterias principales:

Las fibras VIP-IR se localizan en la adventicia de las grandes arterias, fundamentalmente en la unión media-adventicia. La aorta ascendente está innervada por una pequeña y delicada red de fibras nerviosas VIP-positivas. Esta innervación aumenta en sentido distal encontrando un plexo moderadamente denso de varicosidades y pequeños haces nerviosos en la aorta torácica y un plexo importante en la aorta abdominal. En las arterias ilíacas, femorales y poplíteas, la innervación es menor. El tronco pulmonar y las arterias pulmonares principales presentan plexos moderadamente densos de fibras VIP-IR entrelazadas (DELLA ET AL, 1983; WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984).

b) Venas principales:

Las venas principales tienen, por lo general, una inervación escasa por VIP excepto en la desembocadura de la vena cava con el corazón, tanto la craneal como la caudal. A medida que nos alejamos del corazón, la inervación por VIP disminuye rápidamente. Muy pocas fibras, o ninguna, se aprecian en la vena yugular interna, vena cava inferior abdominal y venas pulmonares (DELLA ET AL, 1983).

c) Lechos vasculares regionales:

- **Arteria mesentérica superior:** Un denso plexo de fibras VIP-IR se ha demostrado en el origen de esta arteria en la aorta así como cerca de los orígenes de las ramas hepática, pancreática y duodenal. Las venas correspondientes no están inervadas. También las ramas cólicas están muy inervadas pero la inervación es muy escasa en las arterias ileales. Las arteriolas de la submucosa del íleon y colon se asocian con pocas fibras inmunorreactivas (DELLA ET AL, 1983).

- **Arteria mesentérica inferior:** Tiene una inervación moderada en su origen que aumenta distalmente (ramas cólicas). Las venas presentan también una inervación poco densa.

- **Vascularización de los órganos reproductivos y urinarios:** La arteria uterina principal está rodeada por un plexo denso de fibras VIP-positivas que disminuye al entrar en la pared uterina. No se observa inervación en la vena uterina o sus ramas (SUNDLER ET AL, 1988).

En el tracto urogenital masculino, también existe un rico plexo perivascular en la arteria del conducto deferente y la vejiga así como en el tejido eréctil del bulbo del pene fundamentalmente en relación con las trabéculas y los vasos. La arteria renal posee pocas fibras nerviosas en la unión media/adventicia y aún menor en la vena renal (DELLA ET AL, 1983; SUNDLER ET AL, 1988).

- **Arterias cerebrales:** Alrededor de las arterias cerebrales existe una inervación importante por fibras que contienen VIP, sobre todo en la circulación anterior: arteria cerebral anterior y carótida interna. En la rata, se ha observado que la inervación es menor en las arterias cerebral media, comunicante posterior y basilar y muy escasa en la cerebral posterior y cerebelosa superior. Esta inervación por VIP coexiste con la inervación colinérgica y las fibras nerviosas parece que se originan del ganglio esfenopalatino (HEISTAD ET AL, 1980). Por el contrario, en el cobaya, la arteria basilar presenta sólo fibras aisladas, siendo moderadas en las arterias cerebral posterior y cerebelosa mientras que la comunicante posterior y cerebral media y anterior presentan una rica inervación (DELLA ET AL, 1983).

VI.c.5.- APARATO GENITOURINARIO.

Se ha demostrado la existencia de una densa inervación peptidérgica VIP-IR en el aparato genital masculino y femenino (THILANDER Y RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1989; MULSHOF ET AL, 1994). En el tracto genital femenino porcino, los nervios VIP-IR están asociados con los vasos sanguíneos y con el músculo liso no vascular. Las

concentraciones más altas de nervios VIP-positivos se encuentran en el canal cervical, cérvico-vaginal y útero sin diferencias en los distintos ciclos estrogénicos. Las fibras nerviosas se localizan en la submucosa, capas musculares y adventicia. Existen fibras nerviosas en endometrio (próximas a los vasos y junto a las glándulas uterinas), miometrio (que discurren paralelas a las células musculares) y en el miosalpinx aunque con menor densidad que en el miometrio (SUNDLER ET AL, 1988; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 1990).

En los órganos genitales masculinos, VIP, dadas sus propiedades vasodilatadoras y secretoras, se encuentra en el tejido eréctil del pene (POLAK ET AL, 1981). La próstata recibe una rica inervación VIP-IR distribuida alrededor de los acinis glandulares y vasos sanguíneos (SUNDLER ET AL, 1988).

En el tracto urinario, las fibras son particularmente numerosas en las regiones que poseen función de esfínter (cuello de la vejiga y la porción distal de los uréteres en su entrada en la pared vesical) (SUNDLER ET AL, 1988).

VI.c.6.- ORGANOS DE LOS SENTIDOS.

A) **OJO:** Se ha demostrado la existencia de VIP tanto en retina como en úvea (BRADFORD, 1988). Parece ser que se origina localmente en los cuerpos celulares neuronales y está presente en un intrincado plexo dispuesto alrededor de la coroides. La

presencia de este péptido en la úvea sugiere su posible papel en la respuesta al estímulo doloroso (UNGER ET AL, 1981).

B) PIEL: También se ha demostrado que VIP está presente en las fibras nerviosas que está en íntimo contacto con vasos sanguíneos cutáneos, glándulas sebáceas y sudoríparas ecrinas pero no apocrinas (O'SHAUGHNESSY ET AL, 1981).

VI.d.- COEXISTENCIA DE VIP CON OTRAS SUSTANCIAS NEUROACTIVAS.

VI.d.1.- VIP Y ACh.

Diversos estudios han demostrado la coexistencia de VIP y Acetilcolina (ACh) tanto en el SNC (HARA, HAMILL Y JACOBOWITZ, 1985) (ECKENSTEIN Y BAUGHMAN, 1984) como en el periférico (LUNDBERG ET AL, 1979; LUNDBERG, 1981).

HARA, HAMILL Y JACOBOWITZ (1985) observaron VIP y ACh localizados en las mismas fibras nerviosas alrededor de los vasos cerebrales en ratas, especialmente en la circulación anterior de las arterias cerebrales y de la carótida interna (polígono de Willis). También se demostró la existencia de estas dos sustancias en el ganglio esfenopalatino (ganglio craneal parasimpático) con una marcada reducción de ambas sustancias tras la lesión de dicho ganglio.

Al menos el 80% de las neuronas colinérgicas intrínsecas en la corteza cerebral también presentan inmunorreactividad para VIP e incluso coexisten con SP. Las neuronas que contienen VIP y Ach pueden estar implicadas en la regulación del flujo sanguíneo cortical, ya que están en íntimo contacto con los vasos (capilares y grandes vasos). Estas sustancias se liberarían en los vasos y afectarían el flujo sanguíneo y/o su permeabilidad (ECKENSTEIN Y BAUGHMAN, 1984).

LUNDBERG ET AL (1979, 1981) han demostrado que VIP y ACh coexisten y se liberan de los mismos nervios vasodilatadores de las glándulas salivares, nervios sudomotores y nervios de las glándulas nasales. Estas neuronas conteniendo las dos sustancias, se observaron por primera vez en los ganglios simpáticos lumbosacros y se pensó que estaban implicados en la regulación de la secreción sudorípara (LUNDBERG ET AL, 1979). Posteriormente, se llegó a la conclusión de que la presencia de VIP en las neuronas colinérgicas puede ser una característica general de las neuronas secretomotoras (LUNDBERG, 1981). Se acepta que, una vez liberadas ACh y VIP del mismo terminal nervioso, ACh estimula la secreción tanto por acción directa sobre las células secretoras como por acción indirecta a través de las células mioepiteliales, mientras que VIP origina vasodilatación por relajación de las células musculares lisas que existen alrededor de los vasos sanguíneos. El efecto de la ACh es sensible a la atropina mientras que el de VIP es atropina-resistente.

Por tanto, se piensa que estos dos efectos (la secreción y la vasodilatación en las glándulas exocrinas) se producen tras la liberación de VIP y ACh de los mismos

terminales nerviosos que actuarían sinérgicamente y sobre receptores localizados en dos tipos de células diferentes.

VI.d.2.- VIP Y OTROS NEUROPEPTIDOS.

VIP también existe en las mismas neuronas con otras sustancias: GABA, NPY, CGRP, norepinefrina, encefalina, CCK-8, dinorfina y galanina (CARLQUIST ET AL, 1982; ECKENSTEIN Y BAUGHMAN, 1984; LUTS Y SUNDLER, 1989). Alrededor del 40% de las células que contienen VIP en la corteza cerebral también contienen GABA. NPY y VIP al liberarse de la misma neurona, tienen efectos opuestos sobre la actividad de las células piramidales (NPY la deprime y VIP la estimula). VIP también coexiste con NPY en el esófago humano (WATTCHOW ET AL, 1987) y en las fibras nerviosas del músculo liso traqueobronquial (LUTS Y SUNDLER, 1989) y con SP en las fibras nerviosas de la lámina propia, músculo liso vascular y alrededor de las glándulas del tracto respiratorio (LUTS Y SUNDLER, 1989).

VI.e.- ACCIONES FARMACOLOGICAS DE VIP.

VI.e.1.- VIP EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

Entre las acciones principales de VIP en el SNC están las siguientes:

a) CONTROL DEL METABOLISMO ENERGETICO CENTRAL: En la corteza cerebral, VIP estimula la degradación enzimática de glucógeno a glucosa (DE SOUZA, SEIFERT Y KUCHAR, 1985; MAGISTRETTI ET AL, 1988).

b) EFECTOS NEUROENDOCRINOS: Inyecciones de VIP en el tercer ventrículo de la rata han inducido hipertermia al igual que estimulan la liberación de Hormona de Crecimiento (GH), Hormona Luteinizante (LH) y Prolactina (PRL) (DE SOUZA, SEIFERT Y KUCHAR, 1985).

En el hipotálamo, VIP inhibe la liberación de Somatostatina, estimula la liberación de Serotonina, disminuye el número de receptores serotoninérgicos y estimula la actividad adenilato ciclasa. VIP regula, por tanto, las funciones de la adenohipófisis (BESSON ET AL, 1986).

c) REGULACION DE LA CIRCULACION CEREBRAL: VIP regula el flujo sanguíneo cerebral. La infusión intracarotídea de VIP aumenta el flujo cerebral y presenta un potente efecto vasodilatador de las arterias piales (LARSEN, BOECK Y OTTESEN, 1981).

d) ACCION CARDIOVASCULAR CENTRAL: La administración intraventricular de VIP eleva la tensión arterial media en un 21 % y la frecuencia cardíaca en un 17% en ratas (ENDO ET AL, 1991).

Se ha demostrado que VIP aumenta la concentración plasmática de adrenalina y noradrenalina. Tras resección de la médula adrenal, estas acciones vasculares no ocurren; por otro lado, en ausencia de vasopresina en ratas con diabetes insípida, la administración intracerebroventricular de VIP, origina elevación de la tensión arterial. Por lo tanto, parece ser que la acción cardiovascular central de VIP está mediada por estimulación nerviosa simpática (estimulación de la secreción de adrenalina adrenal) y es aumentada por la ausencia crónica de secreción de vasopresina por la pituitaria posterior (**ENDO ET AL, 1991**).

e) **OSMORREGULACION:** VIP es un péptido importante en la regulación de la secreción de vasopresina y oxitocina de la pituitaria posterior pudiendo intervenir, por tanto, en la osmorregulación corporal (**MAGISTRETTI ET AL, 1988**).

f) **ANALGESIA:** VIP está presente en los ganglios de la raíz dorsal y se concentra en las zonas de la médula espinal donde están los terminales sensitivos primarios. Tanto la administración espinal exógena de VIP como la liberación a partir de los terminales nerviosos produce analgesia por acción sobre las vías del dolor tanto opioides como no opioides (**KOMISARUK ET AL, 1989**).

g) **EFFECTOS SOBRE LA CONDUCTA Y LA MEMORIA:** En el hipocampo, VIP modula los receptores serotoninérgicos. Este efecto está bajo el control de los esteroides adrenales periféricos y puede servir como soporte neurobiológico para las acciones conductuales de este neuropéptido. Se ha demostrado que VIP es un potente

péptido amnésico. Coexiste con neurotransmisores que modulan el proceso de la memoria y se localiza dentro de de las estructuras límbicas. VIP produce amnesia cuando se inyecta en el tercer ventrículo del cerebro o en la porción rostral del hipocampo (FLOOD, GARLAND Y MORLEY, 1990).

VI.e.2.- ACCIONES VISCERALES DE VIP.

VI.e.2.1.- APARATO GASTROINTESTINAL.

Las acciones de VIP en el sistema nervioso del aparato gastrointestinal comprenden (EKLUND ET AL, 1979; WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984; BRADFORD, 1988; GREENWOOD ET AL, 1990):

- Regulación de la motilidad gástrica e intestinal: Relaja el esfínter esofágico inferior y el esfínter pilórico, contrae el cuerpo esofágico e inhibe la peristalsis.
- Aumenta la secreción salivar, aumenta la secreción pancreática de bicarbonato y estimula la secreción de insulina, glucagón y somatostatina.
- Inhibe la secreción de enzimas gástricos y regula la secreción biliar.
- Induce la glucogenolisis en hepatocitos aislados.

VI.e.2.2.- APARATO RESPIRATORIO.

En el aparato respiratorio, VIP interviene en la relajación del músculo liso traqueal y pulmonar y en la regulación de la secreción bronquial (SAID, 1982). Mientras

que los nervios colinérgicos son la vía broncoconstrictora principal, los nervios no-adrenérgicos no-colinérgicos, entre los que se encuentran el neuropéptido VIP, son las únicas vías broncodilatadoras en las vías aéreas humanas y es posible que la función de los nervios que contienen VIP esté alterada en el asma como consecuencia de la inflamación (BARNES, 1992).

VI.e.2.3.- APARATO CARDIOVASCULAR.

VIP presenta importantes propiedades vasodilatadoras tanto a nivel local como sistémico (WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984; FRASE ET AL, 1987; FORSSMANN ET AL, 1988).

FRASE ET AL (1987), tras la administración intravenosa de VIP a sujetos sanos, observaron enrojecimiento y calor facial, eritema corporal y diarrea, síntomas semejantes a los producidos en el síndrome del cólera pancreático originado por la liberación de VIP de tumores secretores de este péptido.

Las acciones de VIP sobre el sistema cardiovascular son:

a) **VASODILATACION:** Tras la infusión sistémica de VIP se origina un descenso de la Resistencia Periférica total del 30% del valor basal (FRASE ET AL, 1987). VIP es un potente vasodilatador coronario (BRUM ET AL, 1986; HOOVER, 1989; GULBENKIAN ET AL, 1993). Tras infusión intravenosa de VIP se origina vasodilatación coronaria con una disminución de la resistencia vascular coronaria del

88% del valor control con la dosis más baja de VIP y del 34% del valor control con la dosis más alta. El efecto vasodilatador coronario es mayor que la vasodilatación en otros órganos (SMITHERMAN Y DEHMER, 1988; KARASAWA ET AL, 1990).

Los efectos vasodilatadores de VIP se ejercen tanto directamente (por un efecto relajante sobre los vasos coronarios de conductancia y de resistencia) como indirectamente (por un incremento en las demandas miocárdicas de oxígeno) (HUANG Y RORSTAD, 1987; FORSSMANN ET AL, 1988). Además, los efectos vasodilatadores de VIP no parecen estar mediados por prostaglandinas ni parecen depender del endotelio intacto (BÉNY, BRUNET Y HUGGEL, 1986; SATA ET AL, 1988).

b) **EFECTO CRONOTROPICO POSITIVO:** Sobre el nodo SA, VIP ejerce un efecto cronotrópico positivo mientras que sobre el nodo AV influye sobre la velocidad de conducción (SMITHERMAN Y DEHMER, 1988; KARASAWA ET AL, 1990). RIGEL (1988) tras la infusión de VIP en la arteria del nodo SA de perros anestesiados, observó que esta sustancia es dos veces más potente que Noradrenalina en aumentar la frecuencia cardíaca. La taquicardia no se afectó por bloqueo de los receptores muscarínicos o beta-adrenérgicos y fue semejante a la taquicardia observada tras la estimulación vagal en presencia de atropina por lo que este autor sugiere que VIP puede ser el neurotransmisor peptidérgico responsable de este fenómeno (FRASE ET AL, 1987; RIGEL, 1988; RIGEL Y LATHROP, 1990, 1991).

c) **HIPOTENSION:** La administración intravenosa de VIP produce disminución de la tensión arterial diastólica y de la tensión arterial media. No afecta, por el contrario, la tensión arterial sistólica (KARASAWA ET AL, 1990).

d) **EFEECTO INOTROPICO POSITIVO:** VIP origina aumento de la contractilidad cardíaca tanto en sujetos sanos (FRASE ET AL, 1987) como en músculos papilares aislados del gato (WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984).

VI.e.2.4.- APARATO GENITOURINARIO.

En los genitales femeninos, VIP media las respuestas no adrenérgicas, no colinérgicas responsables de la relajación del músculo liso, regulación del flujo sanguíneo y de la secreción (OTTENSEN, 1983). Aunque no del todo bien conocido, parece ser que VIP interviene en el control nervioso local del músculo liso uterino (apertura de la unión uterotubárica) y produce vasodilatación en útero y vagina. VIP aumenta el flujo sanguíneo uterino y su concentración aumenta en el coito (OTTENSEN, 1983).

En el masculino, origina relajación del músculo liso del pene y erección. Sobre el riñón, posee acciones secretoras, excretoras y hemodinámicas actuando principalmente sobre el sistema tubular (SUNDLER ET AL, 1988).

VII) INERVACION CARDIACA.

El ciclo cardíaco está regulado por una inervación nerviosa extrínseca consistente en neuronas eferentes simpáticas, neuronas eferentes vagales y neuronas aferentes derivadas de los ganglios sensitivos espinales y vagales. Esta inervación actúa en el tejido cardíaco nodal y sus prolongaciones, en los vasos coronarios y en el músculo cardíaco afectando la bomba cardíaca de dos maneras: a) cambiando la frecuencia del ritmo y b) cambiando la fuerza de la contracción cardíaca.

VII.a.- INERVACION CARDIACA SIMPATICA.

VII.a.1.- ORIGENES CENTRALES.

La inervación cardíaca simpática se origina de los cuerpos celulares de neuronas que se encuentran en el núcleo intermediolateral del asta lateral de la médula espinal, en un territorio comprendido entre los segmentos cervicales bajos y los más altos lumbares (PETRAS Y FADEN, 1978; COHEN, 1986). Sus axones, fibras mielínicas preganglionares, salen de la médula espinal por las raíces nerviosas anteriores a través de los ramos comunicantes blancos de los segmentos espinales T1-T6 para entrar, posteriormente, en la cadena paravertebral de ganglios (COHEN, 1986). Las células de

origen de las neuronas postgangliónicas cardíacas pueden localizarse en los ganglios cervicales superior, medio o inferior y en los primeros ganglios superiores torácicos.

De los ganglios de la cadena paravertebral se originan las fibras postganglionares que van a constituir los nervios cardíacos simpáticos que se dirigen al corazón.

VII.a.2.- NERVIOS CARDIACOS SIMPATICOS.

A) FIBRAS NERVIOSAS EFERENTES.

Comúnmente se describen tres nervios cardíacos a cada lado:

- **NERVIO CARDIACO SIMPatico SUPERIOR:** Se origina del ganglio cervical superior y presenta dos engrosamientos: el ganglio cardíaco superior y el ganglio cardíaco inferior o de Wisberg (lado izquierdo) a nivel del plexo cardíaco.

- **NERVIO CARDIACO SIMPatico MEDIO:** Es el de mayor calibre y en ocasiones está ausente. Se origina en el ganglio cervical medio.

- **NERVIO CARDIACO SIMPatico INFERIOR:** Se origina del ganglio cervical inferior y del primer ganglio torácico o del ganglio estrellado si están fusionados los dos.

Al acercarse al corazón, estos nervios autonómicos forman el plexo cardíaco del que se originan las ramas terminales que se distribuyen en las distintas zonas del corazón

con diferente densidad de inervación (FORSGREN, 1988). La mayor densidad corresponde a la aurículas, y dentro de ellas, el nodo SA, seguido del AV, a continuación los ventrículos, ambos por igual. DOLEZEL ET AL (1980), estableció la existencia de tres tipos de neuronas simpáticas: las que inervan las aurículas, las que inervan los ventrículos y las que inervan la circulación coronaria.

B) FIBRAS NERVIOSAS AFERENTES.

Las fibras nerviosas aferentes mielinizadas son las responsables de la conducción de los estímulos dolorosos y se distribuyen desde las vísceras atravesando los ganglios simpáticos sin hacer sinapsis. Entran en el nervio espinal a través de los ramos comunicantes blancos; sus cuerpos celulares están en los ganglios de la raíz dorsal del nervio espinal correspondiente. Los axones centrales entran en la médula espinal y forman el componente aferente de un arco reflejo local. Otras pueden pasar a centros autonómicos más altos como el hipotálamo (EHINGER ET AL, 1968).

VII.b.- INERVACION CARDIACA PARASIMPATICA.

VII.b.1.- ORIGENES CENTRALES.

El nervio vago es el encargado de llevar la inervación parasimpática al corazón. El origen de las neuronas vagales cardíacas PREGANGLIONARES es el núcleo

ambiguo y/o el núcleo ambiguo ventrolateral que se encuentra en el tronco cerebral (ORTS LLORCA, 1985; WILLIAMS ET AL, 1985; BURKHOLDER ET AL, 1992).

VII.b.2.- NERVIOS CARDIACOS PARASIMPATICOS.

A) FIBRAS NERVIOSAS EFERENTES.

El nervio vago nace a nivel del surco dorsolateral del bulbo y abandona el cráneo por el agujero rasgado posterior donde presenta un engrosamiento denominado ganglio superior o yugular, de carácter somático y relacionado con la sensibilidad visceral (HOVELACQUE, 1927). Al salir del cráneo constituye un segundo engrosamiento, el ganglio inferior, nodoso o plexiforme del vago.

El vago desciende a ambos lados del cuello, dentro de las vainas carotídeas. El vago derecho desciende dorsal a la yugular interna. Dentro del tórax, se sitúa posterior al hilio pulmonar derecho y da muchas ramas bronquiales posteriores que se anastomosan con nervios simpáticos y originan el plexo pulmonar posterior derecho del que se originan ramas del plexo esofágico posterior para constituir, posteriormente, un tronco nervioso retroesofágico que penetrará en el abdomen. El vago izquierdo discurre junto a las arterias carótida primitiva y subclavia izquierda, por detrás del tronco venoso braquiocefálico izquierdo, llega al cayado aórtico y a la cara posterior del bronquio

pulmonar izquierdo y del esófago y forma los plexos pulmonares posteriores y esfágico anterior constituyendo, finalmente, el tronco vagal anterior que penetra en el abdomen.

Los nervios cardíacos procedentes del vago, aunque con gran variabilidad, pueden dividirse en: Nervio cardíaco superior, medio e inferior. Estos nervios cardíacos vagales, después de pasar a través del plexo cardíaco, inervan las estructuras cardíacas. El gradiente decreciente de inervación parasimpática es: nodo SA, orejuela derecha, AD, AI, músculos papilares, pared del VD y pared del VI.

B) FIBRAS NERVIOSAS AFERENTES.

Junto a las fibras eferentes vagales de los nervios cardíacos, existen también fibras aferentes sensitivas mielínicas que son las encargadas de conducir los estímulos dolorosos y que en el corazón de los mamíferos se pueden clasificar en:

- **Terminaciones libres**: Situadas fundamentalmente en el subendocardio auricular aunque también en el subendocardio ventricular, vasos coronarios y adventicia del arco aórtico y arteria pulmonar (FLOYD, 1979).

- **Terminales no encapsulados u "órganos terminales"**: Se localizan principalmente en el subendocardio auricular y en la unión de los vasos principales con las aurículas (NONIDEZ, 1937; EHINGER ET AL, 1968).

VII.c.- PLEXO CARDIACO.

El plexo cardíaco, situado alrededor de los grandes vasos de la base del corazón, está constituido por las anastomosis que unen entre sí los ramos cardíacos del vago y del simpático. El plexo cardíaco se divide en (WILLIAMS ET AL, 1989; ANDERSON, 1972; ANDERSON Y BECKER, 1981; BURKHOLDER ET AL, 1992):

1) **PLEXO CARDIACO SUPERFICIAL (ANTERIOR)**: Situado por debajo del arco aórtico y ventral a la arteria pulmonar derecha. Está constituido por el nervio cardíaco superior del simpático cervical izquierdo y por el nervio cardíaco superior de los vagos. Presenta una mayor densidad de fibras simpáticas.

2) **PLEXO CARDIACO PROFUNDO (DORSAL)**: Presenta mayor densidad de fibras parasimpáticas. Es más extenso y compacto que el superficial y se localiza por delante de la bifurcación traqueal, por encima de de la bifurcación pulmonar, sobre la división del tronco pulmonar y posterior al arco aórtico. Está formado por los ramos cardíacos del simpático cervical y superior torácico y por los nervios cardíacos medio e inferior de los vagos (vago y recurrente laríngeo).

3) **PLEXOS CORONARIOS**: El izquierdo es mayor que el derecho, acompaña a la arteria coronaria izquierda e inerva AI y VI. El plexo coronario derecho acompaña a la arteria coronaria derecha para inervar AD y VD.

4) **PLEXOS AURICULARES:** Sus fibras se distribuyen en las aurículas, superponiéndose con las de los plexos coronarios. Según **MIZERES (1963)**, son prolongaciones del plexo cardíaco que han seguido ramas de la arteria pulmonar. Existen dos: **Derecho**, entre la VCS y la Aorta ascendente, con ramas para la pared posterior de la AD, e **izquierdo**, que discurre directamente dentro de la pared auricular izquierda posterior, emitiendo ramos para las paredes posteriores de ambos ventrículos.

Según **WILLIAMS ET AL (1989)**, aunque con grandes variaciones, las fibras simpáticas de origen más craneal terminan distribuyéndose sobre la aorta ascendente, tronco de la pulmonar y ventrículos, y las de origen más caudal sobre las aurículas. Las fibras parasimpáticas, preganglionares hasta su llegada a los ganglios del corazón, se distribuyen en el tabique interauricular, aurículas y regiones nodales.

VII.d.- INTERACCIONES SIMPATICO-PARASIMPATICO.

La regulación autonómica del corazón se lleva a cabo por las complejas interacciones existentes entre los componentes simpático y parasimpático. La base anatómica de estas interacciones está determinada por la íntima proximidad existente entre los terminales nerviosos adrenérgicos, terminales colinérgicos y las células miocárdicas. Así, los neurotransmisores y neuromoduladores liberados de las fibras nerviosas de una división autonómica pueden influir en la liberación de neurotransmisores de las terminaciones nerviosas de la otra división (**PAPKA ET AL, 1981; MACE Y**

LEVY, 1983; YANG Y LEVY, 1992; CHOW ET AL, 1993). Las interacciones pueden comprender mecanismos presinápticos o postsinápticos:

- **INTERACCION PRESINAPTICA:** La ACh liberada de los terminales nerviosos vagales debe inhibir la liberación de Nor de los nervios simpáticos postgangliónicos cercanos.

- **INTERACCIONES POSTSINAPTICAS:** Los neurotransmisores adrenérgicos y colinérgicos deben actuar sobre la misma célula miocárdica. Esta interacción puede resultar en cambios en los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc. El GMPc que aumenta (intracelularmente) en respuesta a la estimulación del receptor muscarínico, puede antagonizar los efectos inotrópicos mediados por AMPc en respuesta a la estimulación de los receptores beta-adrenérgicos.

Un dato característico de la interacción autonómica cardíaca es que los efectos vagales tienden a predominar sobre los efectos simpáticos cuando ambos se estimulan simultáneamente, especialmente en lo que se refiere a la frecuencia cardíaca (**MACE Y LEVY, 1983; YANG Y LEVY, 1992**). Sin embargo, cuando la activación simpática precede a la vagal, la predominancia vagal disminuye. Esto se podría deber a que se libera NPY (además de Nor) que inhibe la liberación de ACh durante un período de tiempo más prolongado.

Cuando la activación vagal precede a la simpática, la predominancia vagal no se afecta. Se liberaría ACh que inhibe la liberación de Nor pero sólo por un período de tiempo limitado.

Por ello, parece que los distintos efectos en la interacción autonómica se deben probablemente a las distintas duraciones de acción de los neurotransmisores clásicos (Nor y ACh) y de los neuropéptidos (NPY) (YANG Y LEVY, 1992).

MATERIAL Y METODOS

D) DESARROLLO DEL MODELO EXPERIMENTAL.

I.a.- ESPECIE ANIMAL Y CONDICIONES GENERALES DE ESTABULACION.

La especie animal elegida en nuestro trabajo fue la rata blanca cepa Wistar (Charles River).

Se emplearon 116 ratas hembras adultas que fueron seleccionadas cuando alcanzaron un peso entre 150-250 gramos que corresponde a una edad comprendida entre 8 y 12 semanas (madurez sexual) y cuyo tamaño es suficiente para facilitar el estudio estructural e inmunohistoquímico de las estructuras cardíacas.

Fueron estabuladas en jaulas de macrolón tipo 1000 para rata de 215 x 465 x 145 mm³ sobre lecho de serrín de madera higienizado que fue sustituido diariamente y mantenidas en un ambiente con temperatura entre 21 + 3° C. Los animales, que viven en un ritmo nictameral invertido, fueron sometidos a un fotoperíodo de 12 horas y alimentados con libre acceso a Dieta Completa para rata-ratón PANLAB y agua.

La distribución de los animales fue:

Definición de las zonas a estudiar 8

Grupo CONTROL 11

Grupo A:

DISTRIBUCION MORFOLOGICA DE NEUROPEPTIDOS

- Sistema de conducción 15

- Paredes miocárdicas 10

- Coronarias 10

- Grandes vasos 11

Grupo B:

TRATAMIENTO CON 6-HIDROXIDOPAMINA 25

NPY: Tratamiento 1 5

Tratamiento 2 5

Tratamiento 3 5

SP: 5

VIP: 5

Grupo C:

TRATAMIENTO CON CAPSAICINA 26

SP: Tratamiento 1 8

Tratamiento 2 8

NPY: 5

VIP: 5

I.b.- JUSTIFICACION DE LA ESPECIE ANIMAL.

La rata de laboratorio es uno de los animales más empleados en estudios morfológicos cardiovasculares por ofrecer múltiples ventajas. La elección de la rata en el presente trabajo se basó, por un lado, en la relativa facilidad de manejo en cuanto a tamaño, al menor coste económico para su obtención y mantenimiento respecto a otros animales de experimentación, a la gran semejanza existente entre el sistema cardiovascular de la rata y el de otros mamíferos, incluido el hombre y a que los anticuerpos monoclonales empleados para detectar neuropéptidos procedentes de distintas casas comerciales, son más específicos para la rata (**CAMPBELL, MARTIN GERDES y SMITH, 1987**).

II) DEFINICION DE LAS ZONAS A ESTUDIAR.

Ocho animales se emplearon en estudios preliminares para definir la localización exacta y la morfología de las estructuras a estudiar, así como su orientación espacial (**JAMES, 1977; ANDERSON y BECKER, 1981**). Para ello, los bloques cardíacos se fijaron por inmersión en formol neutro al 10% en PBS 0,1 M (pH 7,4) durante 48-72 horas. A continuación, fueron procesados para su inclusión en parafina según las técnicas habituales de nuestro laboratorio y se cortaron de forma seriada con un microtomo Leitz 1.512 a 7 μm . de espesor procediendo posteriormente a la tinción con Hematoxilina-Eosina.

Las zonas estudiadas fueron:

- a) Nodo sinoauricular (Nodo SA)
- b) Septum interauricular
- c) Nodo auriculoventricular (Nodo AV)
- d) Haz de His y sus ramas
- e) Pared miocárdica de aurícula derecha (AD), aurícula izquierda (AI), ventrículo derecho (VD) y ventrículo izquierdo (VI).
- f) Arterias coronarias
- g) Grandes vasos

III) PREPARACION DEL TEJIDO: METODOLOGIA.

III.a.- OBTENCION Y FIJACION.

Las ratas fueron anestesiadas con Pentobarbital sódico (Abbot Laboratories, North Chicago, IL) a dosis de 30-40 mg/kg. Tras la apertura de la cavidad torácica se insertó un catéter en la aorta torácica realizando en primer lugar la perfusión con 50-100 ml de suero isotónico 0,9% a temperatura ambiente durante 2 minutos para conseguir el arrastre de los hematíes del lecho vascular, con lo que se evita la aparición de posibles artefactos. Seguidamente, se perfundieron durante 30 minutos 500 ml de la solución fijadora de Paraformaldehído al 4% (PFA) en Fosfato Buffer Salino (PBS) 0,1 M pH 7,4 a 4° C. El PFA 4% es un fijador válido para la detección de péptidos y hormonas, puesto que

asegura una buena preservación de las estructuras antigénicas. Otros fijadores como el formol-sublimado o el glutaraldehído, inducen la aparición de una fluorescencia inespecífica (**PALACIN FORGUE, 1984**).

Tras la extracción de los corazones junto con los vasos adyacentes, fueron fijados por inmersión en la misma solución de PFA 4% durante un período de 3 horas a 4° C. Posteriormente, se realizaron tres pases sucesivos del bloque cardíaco y grandes vasos por soluciones de PBS 0,1 M (pH 7,4) conteniendo 10% y 20% de sucrosa durante 1 hora cada uno y dejándolas durante toda la noche en solución de PBS-Sucrosa 30% a 4° C en agitación continua.

III.b.- INCLUSION.

Una vez fijados, los corazones se congelaron en bloques individuales rodeados de medio de montaje (Tissue Tek, Miles Inc., Elkhart, USA) manteniéndose conservados en arcón congelador a -80° C hasta su procesamiento.

Los bloques de tejido almacenados a esta temperatura pueden mantenerse durante al menos 2 ó 3 meses antes de llevar a cabo la reacción inmunohistoquímica sin que se produzca ninguna pérdida de actividad antigénica (**BOURNE, 1983**).

III.c.- SECCION.

Se empleó un criostato Leitz 1720 digital para la seriación del tejido cardíaco. Los bloques se situaron en el criostato, enfriado previamente a - 20° C y se cortaron seriadamente en secciones de 12 μ m de espesor según un plano frontal en dirección ventrodorsal (para el estudio de nodos y sistema de conducción) y según un plano transversal en dirección craneocaudal (para estudiar, fundamentalmente, la vascularización).

Las secciones se adhieren a portas gelatinados cromados para asegurar un correcto anclaje de las mismas durante todo el proceso inmunohistoquímico, gracias a la diferencia de temperatura que existe entre el interior del criostato y el portaobjetos.

IV) INMUNOHISTOQUIMICA.

IV.a.- ANTICUERPOS MONOCLONALES:CRITERIOS DE SELECCION

Con el fin de homogeneizar los resultados en lo que a identificación y demostración de los distintos neuropéptidos objeto de nuestro estudio se refiere, procedimos a la realización de un test de control para los diferentes anticuerpos de distintas casas comerciales en idénticas condiciones de fijación y procesamiento de las piezas. Tras la realización del protocolo inmunohistoquímico (posteriormente descrito)

las piezas estudiadas con anticuerpos monoclonales sintetizados y distribuidos por la casa INCSTAR (INCSTAR Corporation, Stillwater, Minnesota, USA) fueron las que mostraron mayor nitidez, menor número de artefactos y mayor estabilidad, motivo por el cual decidimos emplear dicho Anticuerpo Monoclonal en la realización del presente trabajo.

IV.b.- ANTICUERPOS MONOCLONALES: CARACTERISTICAS.

IV.b.1.- SUSTANCIA P (SP).

Se empleó el anticuerpo dirigido contra SP de la casa INCSTAR (INCSTAR Corporation, Stillwater, Minnesota, USA). El anticuerpo para SP se obtiene por inmunización de conejo con SP conjugado a hemocianina con carbodiimida.

La localización inmunohistoquímica del antisuero se examinó en secciones de la médula espinal de la rata. El marcaje se eliminó por completo mediante pretratamiento del anticuerpo diluido con 100 μg de SP por ml de antisuero diluido.

La reactividad cruzada se testó por preabsorción con 2 μl , 100 picomoles (pmol) de diversos péptidos reguladores (Neurokinina A, Neurokinina B, Colecistoquinina, Serotonina, Somatostatina, Leu-enkefalina, Met-enkefalina, Neurotensina y Péptido Intestinal Vasoactivo), no existiendo reacción cruzada con el antisuero SP diluido 1/500.

El anticuerpo monoclonal anti-SP se comercializa en envases de 0,1 ml que a su llegada son reconstituidos con 100 μ l de agua desionizada empleando Vortex Heidolph Reax 2000 y preparándose alícuotas de 10 μ l que se depositan en tubos Eppendorf y se almacenan en arcón congelador a - 80° C hasta el momento de su utilización, diluyéndose entonces en PBS-Tritón a una dilución de 1/100. El Tritón permeabiliza la membrana celular sin modificar su estructura permitiendo un mayor paso de anticuerpo al interior de la célula.

La dilución óptima de trabajo del anticuerpo es la que obtuvimos al realizar el testado con diferentes diluciones del mismo donde la ausencia de tinción inespecífica en las células negativas, se acompaña de una tinción adecuada de las células y/o fibras nerviosas positivas. Hay que realizarla utilizando siempre la dilución más alta posible con la que consigamos mayor contraste entre zonas positivas específicas y el fondo (PALACIN FORGUE, 1984).

IV.b.2.- PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP).

Se empleó el anticuerpo dirigido contra VIP de la casa INCSTAR. El anticuerpo para VIP se genera en conejo contra VIP porcino natural.

La localización inmunohistoquímica del antisuero se examinó en la amígdala de la rata. La reactividad cruzada fue testada por preabsorción con 2 μ l, 100 pmol de los péptidos: Motilina, Polipéptido Pancreático, Polipéptido Inhibidor Gástrico, Insulina,

Glucagón, Somatostatina, Gastrina, ACTH, Serotonina, SP e Histamina, no encontrándose reacción cruzada con el antisuero VIP diluido 1/500.

Igualmente se prepararon alícuotas de 10 μ l en tubos Eppendof. La dilución en PBS-Tritón fue 1/500.

IV.b.3.- NEUROPEPTIDO Y (NPY).

El anticuerpo dirigido contra NPY también fue de la casa INCSTAR. Se genera en conejo contra NPY porcino sintético conjugado con albúmina sérica bovina metilada.

La localización inmunohistoquímica del antisuero se examinó en secciones del Sistema Nervioso Central de la rata. La tinción se eliminó completamente por pretratamiento del anticuerpo diluido con 100 μ g de NPY porcino sintético por ml de antisuero diluido.

Para examinar la reactividad cruzada se realizó preabsorción con 2 μ l, 100 pmol de distintos péptidos (Beta-endorfina, VIP, Colecistokinina y Somatostatina) sin encontrar reacción cruzada con NPY.

Depositados en tubos Eppendof con alícuotas de 10 μ l, la dilución del anticuerpo fue 1/100.

IV.c.- METODOLOGIA EMPLEADA.

Describimos a continuación la metodología empleada en este trabajo para la realización de la técnica de **INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA**.

Esta técnica se basa en el empleo de un anticuerpo primario dirigido contra un antígeno específico en el tejido al que posteriormente se acopla un anticuerpo secundario, que se une al primario, y que es fluorescente (es decir, que tiene la propiedad de emitir una radiación de espectro visible, cuando se la ilumina con una radiación de longitud de onda más corta, azul o ultravioleta (**MASON ET AL, 1969**)). Las sustancias fluorescentes más empleadas son los derivados de la fluoresceína, esencialmente el isotiocianato de fluoresceína, con una fluorescencia de color verdoso, y los derivados de la rodamina, fundamentalmente el isotiocianato de tetrametil rodamina con una fluorescencia rojo-anaranjada.

El esquema de trabajo seguido es una modificación de la técnica empleada por diversos autores (**COONS, 1958; HARTMANN, 1973; HÖKFELT, FUXE Y GOLDSTEIN, 1975; POLAK y VAN NOORDEN, 1983; PRADOS FRUTOS, 1987; PRADOS ET AL, 1987**) y de las aconsejadas por la casa comercial proveedora de los anticuerpos utilizados.

La técnica empleada para las inmunotinciones ha sido la misma para los tres anticuerpos monoclonales utilizando el anticuerpo correspondiente a la dilución ya expuesta en la sección previa.

Los distintos reactivos se pesaron en balanza de precisión Sartorius Handy H 110. Para medir el pH de las soluciones, se utilizó el pHmetro Microph 2001 Crison.

METODOLOGIA:

1) SECADO DE LA PREPARACION:

Una vez montadas las secciones sobre el porta, éste se coloca en platina a 60° C durante 1 minuto con lo cual, según nuestra experiencia, se obtiene una adhesión más rápida y duradera de aquéllas al porta (**GIL LOYZAGA, Comunicación personal**). Esta adhesión es esencial para prevenir la pérdida de tejido durante las incubaciones y lavados subsiguientes.

2) LAVADOS:

Tres lavados en Fosfato Bufer Salino (PBS) 0,1 M (pH 7,4) de 10 minutos cada uno por inmersión y con agitación suave continua con agitador electrónico Heidolph.

3) ANTICUERPO PRIMARIO ESPECIFICO:

Se utilizan cada uno de los tres anticuerpos descritos cubriendo cada sección con 50-100 μ l del anticuerpo diluido a la dilución correspondiente, incubándolos a 4° C

durante 12 a 24 horas. Para evitar la desecación de los portas, éstos se colocaron en cámara húmeda.

4) LAVADOS:

- Primer baño en PBS 0,1 M (pH 7,4): 10 minutos.
- Segundo baño en PBS 0,1 M (pH 7,4): 10 minutos.
- Tercer baño en PBS 0,1 M (pH 7,4): 10 minutos.

5) SEGUNDO ANTICUERPO:

Se ha utilizado como segundo anticuerpo inmunoglobulina (Ig) cabra-antirratón conjugada con isocianato de fluoresceína (GAM-FITC, Nordic), realizándose alícuotas de 20 μ l del mismo que se depositaron en tubos Eppendorf y se congelaron hasta el momento de su utilización, diluyéndose entonces en PBS (1/50) suplementado con NCS al 2%. El tubo Eppendorf conteniendo la solución anterior se centrifugó durante 5 minutos a 7000 rpm en centrifugadora Sigma 302 K.

El siguiente paso fue la aplicación de 50-100 μ l por preparación de GAM-FITC sobre los portas, permaneciendo éstos durante 60 minutos, a temperatura ambiente, en oscuridad y en cámara húmeda.

6) LAVADOS:

- Primer baño en PBS 0,1 M (pH 7,4): 10 minutos.
- Segundo baño en PBS 0,1 M (pH 7,4): 10 minutos.

- Tercer baño en PBS 0,1 M (pH 7,4): 10 minutos.

7) MONTAJE DE LAS PREPARACIONES:

El cubreobjetos se monta con glicerol-PBS (7:3). Las preparaciones se conservan a 5° C hasta el momento de su observación.

8) OBSERVACION DE LAS PREPARACIONES:

Las preparaciones se estudiaron con un microscopio NIKON LABOPHOT equipado con luz Ultravioleta, alimentado con una lámpara de mercurio Nikon HBQ-W/2.

Los cortes más característicos fueron fotografiados con película Kodak Ektachrome 400 ASA.

Las preparaciones guardan positividad, conservadas a 5° C, durante un período de tiempo variable, generalmente 5-6 días, siendo deseable su estudio en período máximo de 48 horas.

IV.d.- TECNICAS DE CONTROL DE LAS INMUNOTINCIONES.

Para evitar los falsos positivos y falsos negativos por errores en las técnicas, se han realizado controles para asegurar la fiabilidad de los datos obtenidos (lámina I) (GULBENKIAN ET AL, 1993).

LAMINA I

CONTROLES

1.- Nodo SA. Sustitución del anticuerpo primario (SP) por suero normal. Ausencia de inmunorreactividad para SP (20 x).

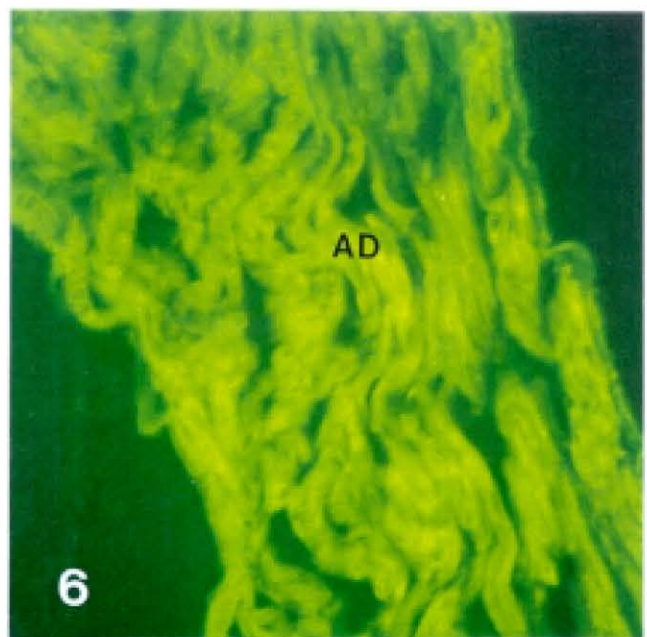
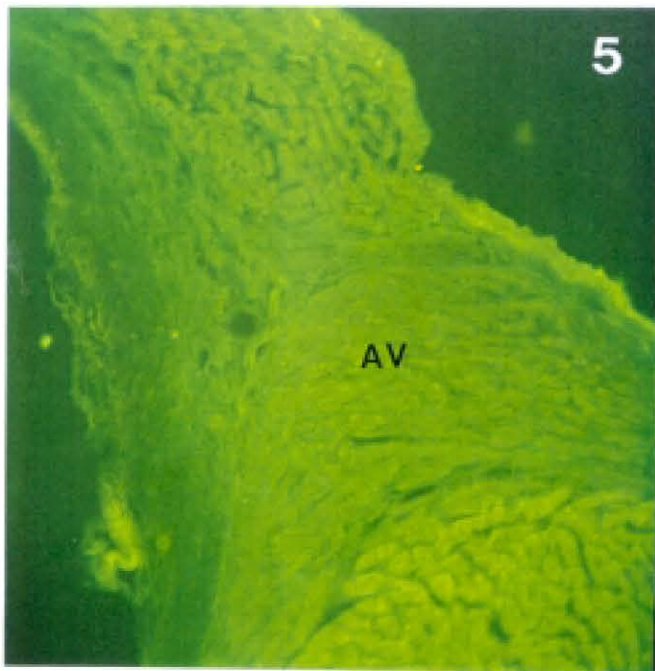
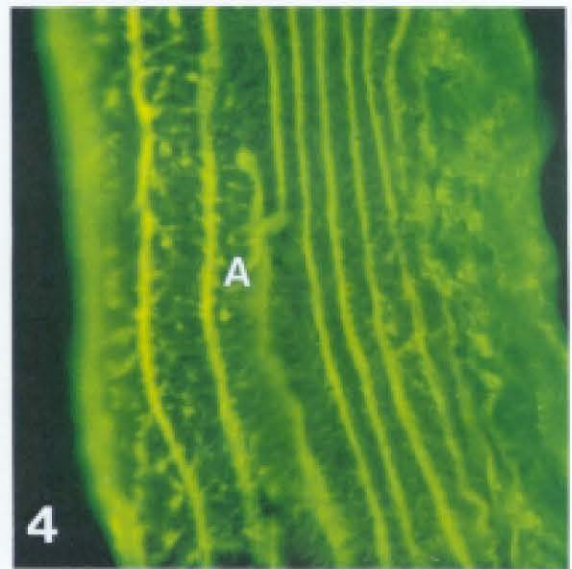
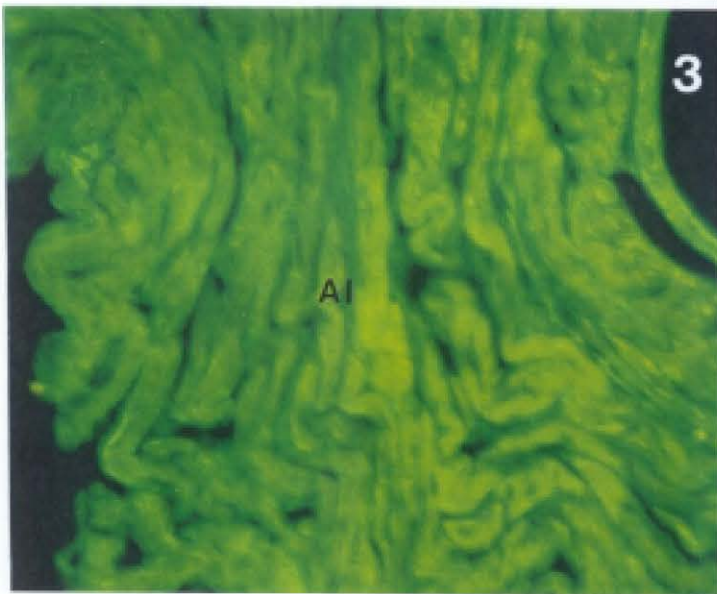
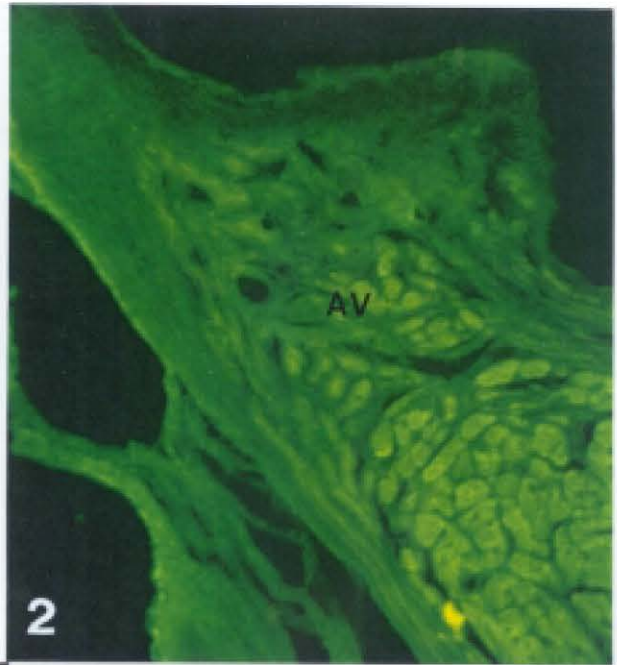
2.- Nodo AV. Sustitución del anticuerpo primario (VIP) por suero normal sin fibras nerviosas VIP-IR (20 x).

3.- Pared de AI. Sustitución del segundo anticuerpo por PBS. Ausencia de inmunorreactividad (20 x).

4.- Aorta. Sustitución del anticuerpo primario (SP) por suero normal (20 x).

5.- Haz AV. Ausencia de fibras nerviosas NPY-IR tras la sustitución del anticuerpo primario (NPY) por suero normal (20 x).

6.- Pared de AD. Preparación sin teñir para descartar autofluorescencia (20 x).



-CONTROLES.

- 1) Sustitución del anticuerpo primario (SP, VIP o NPY) por suero normal o preinmune de conejo (preparado como el anticuerpo primario).
- 2) Preparación sin teñir, para descartar autofluorescencia.
- 3) Sustitución del segundo anticuerpo por PBS.
- 4) Realización de la técnica en muestras de tejidos ya conocidos como positivos, con el anticuerpo en estudio.

-AUTOFLUORESCENCIA:

Determinadas estructuras tisulares o celulares muestran cierto grado de autofluorescencia; también algunos fijadores, como el formol-sublimado o el glutaraldehído, inducen la aparición de una fluorescencia inespecífica (**PALACIN FORGUE, 1984**).

Entendemos por **FALSO POSITIVO**, la inmunotinción positiva de elementos celulares o tisulares que no deberían teñirse. Los falsos positivos pueden aparecer por reacción cruzada del anticuerpo con antígenos diferentes de los buscados o por uniones inespecíficas del anticuerpo al tejido (**ROSAI, 1989**).

Por **FALSO NEGATIVO** se entiende la no inmunotinción de elementos celulares o tisulares que deberían haberse teñido positivamente. Como causas de falsos negativos, tenemos (**ROSAI, 1989**):

- a) Emplear un anticuerpo inapropiado, desnaturalizado o usado a una concentración incorrecta.
- b) Por pérdida del antígeno por autólisis y/o difusión.
- c) Presencia del antígeno a una densidad por debajo del nivel de detección con los reactivos y técnicas empleados, bien a causa de una mínima producción o de una excesiva liberación.

En nuestro estudio, la reacción de fluorescencia específica observada se distinguió claramente de la reacción de autofluorescencia de coloración amarillenta. De esta manera, se puede diferenciar esta reacción en la media de las paredes arteriales y la autofluorescencia de las fibras de tejido conectivo.

V) ANIMALES TRATADOS CON 6-HIDROXIDOPAMINA.

Para conseguir una degeneración de los terminales nerviosos simpáticos cardíacos, realizamos simpatectomía química mediante la administración intraperitoneal de 6-OH-DA a un grupo de ratas hembras adultas de similares características a las empleadas en los estudios previos.

Con el objeto de determinar la dosis óptima para la cual la simpatectomía fuera completa (y con ello, determinar el máximo grado de deplección de NPY por 6-OH-DA)

se administraron distintos esquemas de tratamiento con 6-OH-DA, observándose los resultados en distintos períodos de tiempo tras la administración de la última dosis de esta sustancia.

La distribución de los animales, dosis e intervalos fue:

TRATAMIENTO 1:

Número de animales 5

Dosis total de 6-hidroxidopamina 75 mg/kg

Dosificación

Día 1: 25 mg/kg

Día 2: 25 mg/kg

Día 7: 25 mg/kg

Intervalo entre la última dosis

y el sacrificio 24 h.

TRATAMIENTO 2:

Número de animales 5

Dosis total de 6-hidroxidopamina 150 mg/kg

Dosificación

Día 1: 50 mg/kg

Día 2: 50 mg/kg

Día 7: 50 mg/kg

Intervalo entre la última dosis

y el sacrificio 24 h.

TRATAMIENTO 3:

Número de animales **5**

Dosis total de 6-hidroxidopamina **500 mg/kg**

Dosificación

Día 1: 200 mg/kg

Día 7: 300 mg/kg

Intervalo entre la última dosis

y el sacrificio **48 h.**

La solución de 6-OH-DA hidrobromida (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) se preparó mediante la disolución del producto en agua destilada con ácido ascórbico (1 mg/ml) inyectándose intraperitonealmente con los esquemas de tratamiento expuestos para los distintos grupos de animales. Debido a la rápida pérdida de actividad de la 6-OH-DA una vez que se ha disuelto, la dosis correspondiente se administró inmediatamente después de su disolución.

Una vez completado el tratamiento, los animales fueron sacrificados, los corazones y grandes vasos extraídos y procesados para los estudios inmunohistoquímicos descritos previamente.

VI) ANIMALES TRATADOS CON CAPSAICINA.

Puesto que la capsaicina posee propiedades marcadamente irritantes cuando se aplica a la piel, los animales fueron anestesiados con éter previamente a la administración de la primera inyección de capsaicina con el fin de sensibilizarlos frente a las inyecciones sucesivas de esta sustancia. La solución de **Capsaicina** (8-metil-N-vanilil-6-nonenamida; Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO) se preparó mediante la disolución del producto en Polioxietileno sorbitan monooleato (Tween-80) 10% (Sigma Chemicals Co., St. Louis, MO): Etanol 10%: Solución salina 80%.

Los animales fueron tratados mediante inyecciones subcutáneas de capsaicina, durante 4 días sucesivos y con dos esquemas de tratamiento diferentes con el fin de determinar la dosis óptima que originase una degeneración completa de los terminales nerviosos nociceptivos:

TRATAMIENTO 1:

Número total de animales **8**

Número de animales válidos **5**

Dosis total de capsaicina **125 mg/kg**

Dosificación

Día 1: **25 mg/kg**

Día 2: **25 mg/kg**

Día 3: **25 mg/kg**

Día 4: **50 mg/kg**

TRATAMIENTO 2:

Número total de animales **8**

Número de animales válidos **6**

Dosis total de capsaicina **260 mg/kg**

Dosificación

Día 1: 40 mg/kg

Día 2: 40 mg/kg

Día 3: 80 mg/kg

Día 4: 100 mg/kg

A los 12 días de la administración de la 1ª dosis de capsaicina, se comprobó si el tratamiento había sido adecuado originando una desensibilización total. Para ello, aplicamos una solución de capsaicina (1%) diluida en suero salino en la córnea de los animales sometidos a tratamiento según el método de Gamse, en el cual, la respuesta de retirada, observada en animales no tratados, desapareció totalmente en animales tratados, indicando desensibilización total (GAMSE, 1982). De las ratas tratadas con capsaicina, cinco mostraron algún movimiento de retirada siendo excluidos del presente estudio.

Comprobado esto, los animales fueron anestesiados y sus corazones preparados para estudios inmunohistoquímicos según la metodología ya descrita en las secciones previas con el fin de determinar los efectos del tratamiento con capsaicina sobre las fibras nerviosas (SP-, NPY- y VIP-IR) que inervan el corazón y grandes vasos.

RESULTADOS

D) DEFINICION DE LAS ZONAS A ESTUDIAR

La localización y morfología de las zonas estudiadas fue (láminas II y III):

A) NODO SINOAURICULAR (Nodo SA).

El nodo SA se localiza en posición subepicárdica en la unión entre la Vena Cava Superior (VCS) cuando ésta desemboca en la Aurícula Derecha en el sulcus terminalis y el extremo craneal de la crista terminalis. El nodo se dispone alrededor de una prominente arteria nodal y tiene una forma fusiforme siendo más pálido que el tejido auricular adyacente. El corazón se seccionó seriadamente según un plano frontal en dirección ventrodorsal hasta que se identificó el nodo SA.

B) SEPTUM INTERAURICULAR.

Comprendido entre la unión de la VCS y la crista terminalis, donde se localiza el nodo SA, y la región del ostium del seno coronario, donde se localiza el nodo Auriculoventricular.

C) NODO AURICULOVENTRICULAR (Nodo AV).

El nodo AV ocupa una pequeña área fibrosa entre la Aurícula Derecha y el Ventrículo Izquierdo. Se localizó en la base del septum interauricular (en la unión de los septos muscular y membranoso), subyacente al anillo fibroso de la inserción de la valva septal de la válvula tricúspide, bajo el endocardio de la Aurícula Derecha y anterior al

seno coronario en una región rica en tejido conectivo. La inserción de la valva septal de la válvula mitral se dispone en un eje oblicuo respecto al septum cardíaco; este eje oblicuo queda definido, de craneal a caudal por la valva septal de la válvula mitral, el nodo AV y la valva septal de la válvula tricúspide. El corazón se seccionó seriadamente según un plano frontal en dirección ventrodorsal hasta que se identificó de este modo el nodo AV.

D) HAZ DE HIS Y SUS RAMAS.

Analizamos el tejido de conducción en secciones a través del tronco del haz de His. El haz de His se origina de la porción antero-distal del nodo AV; se dispone a lo largo de la unión del septum membranoso con el muscular estando, por tanto, en la parte inferior del septum interauricular, entre la Aurícula Derecha y el Ventrículo Izquierdo.

A nivel intraventricular, el haz de His se aproxima a la raíz aórtica bifurcándose a este nivel en sus dos ramas:

- **Rama izquierda:** discurre por el borde izquierdo del septum interventricular.
- **Rama derecha:** Alcanza el lado derecho del septum, ramificándose en el ápex ventricular.

E) PARED MIOCARDICA DE AURICULA DERECHA (AD).

Se estudió el miocardio de la AD en el ángulo entre el septum y la pared más externa de la AD, incluyendo endocardio y epicardio.

F) PARED MIOCARDICA DE AURICULA IZQUIERDA (AI).

El análisis fue semejante a la AD.

G) PARED MIOCARDICA DE VENTRICULO DERECHO (VD).

El miocardio del VD, incluyendo endocardio y epicardio, se estudió en la porción media de su pared libre.

H) PARED MIOCARDICA DE VENTRICULO IZQUIERDO (VI).

Semejante al VD.

I) ARTERIAS CORONARIAS.

Se estudió la pared arterial (íntima, media y adventicia) y el tejido perivascular de las arterias coronarias DERECHA e IZQUIERDA a nivel de masa ventricular subepicárdica.

J) GRANDES VASOS.

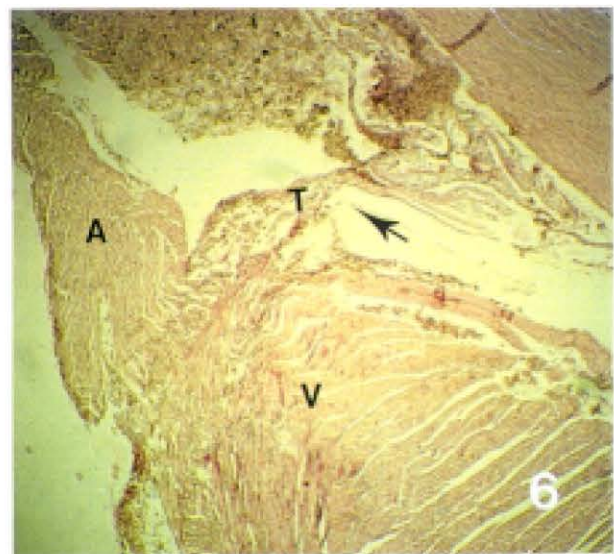
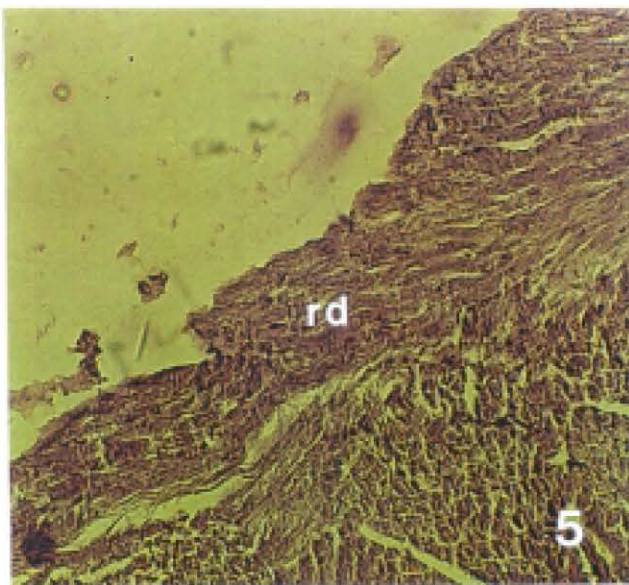
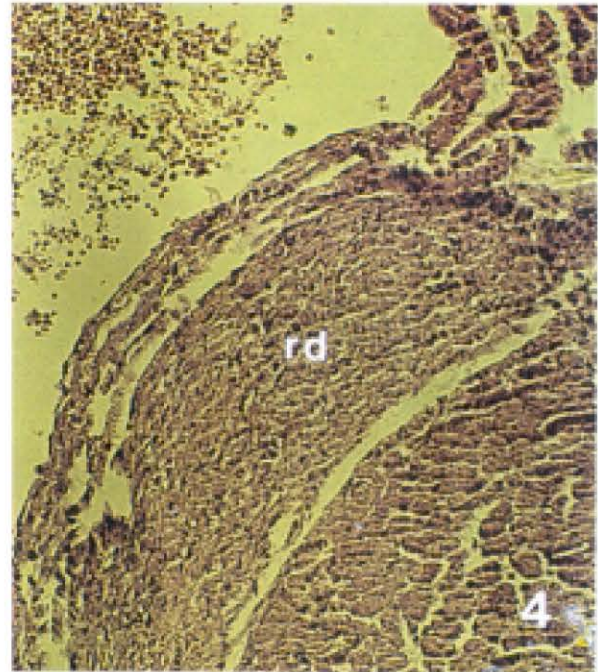
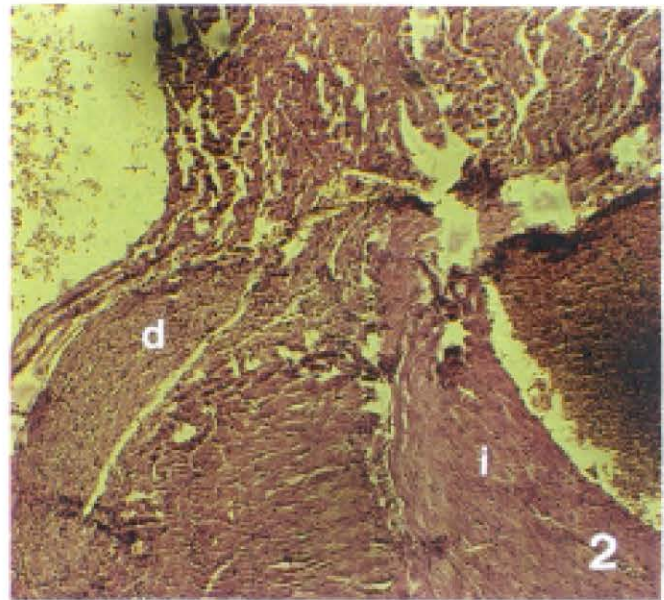
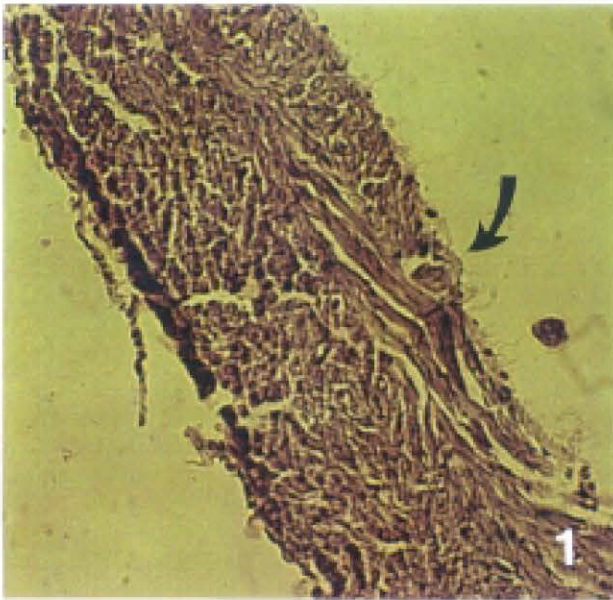
Se estudió la pared de los grandes vasos y el tejido perivascular a nivel de:

- a) **AORTA:** Desde su origen en Ventrículo Izquierdo hasta el arco aórtico.
- b) **TRONCO ARTERIAL PULMONAR:** Desde Ventrículo Derecho a la bifurcación.
- c) **VENA CAVA SUPERIOR:** A nivel de la desembocadura en la Aurícula Derecha.

LAMINA II

SELECCION DE LAS ZONAS A ESTUDIAR

- 1.- Nodo SA. Flecha: arteria central del nodo. H/E (20 x).
- 2.- Ramas derecha (d) e izquierda (i) del haz de His. H/E (20 x).
- 3.- Septum interauricular. H/E (20 x).
- 4.- Rama derecha proximal. H/E (20 x).
- 5.- Rama derecha distal. H/E (20 x).
- 6.- Inserción de la válvula Tricúspide (T); V:ventrículo; A:aurícula. H/E (20 x).



LAMINA III

SELECCION DE LAS ZONAS A ESTUDIAR

7.- Pared de AD. H/E (20 x).

8.- Pared de AI. H/E (20 x).

9.- Pared de VD. H/E (10 x).

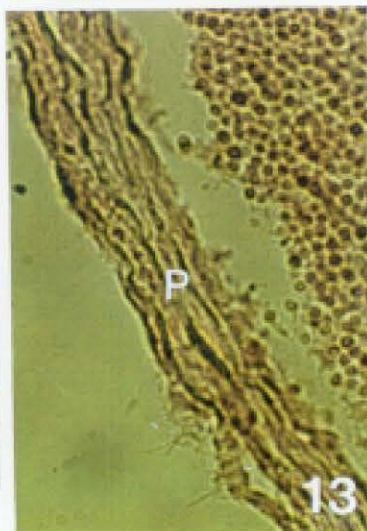
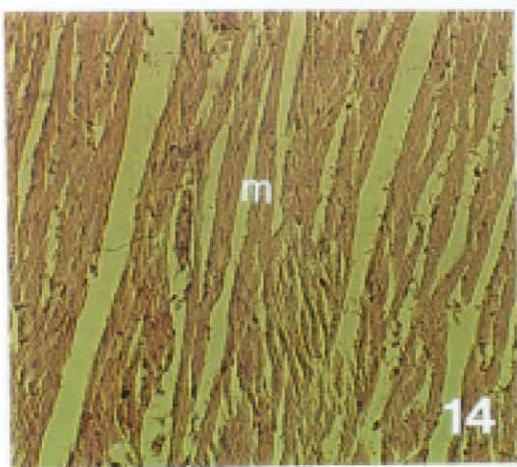
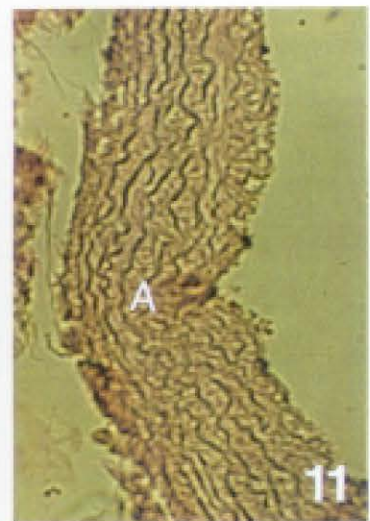
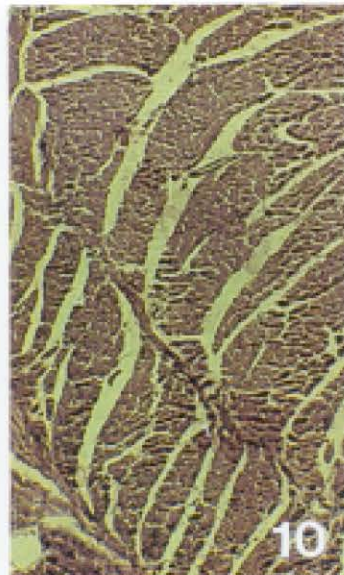
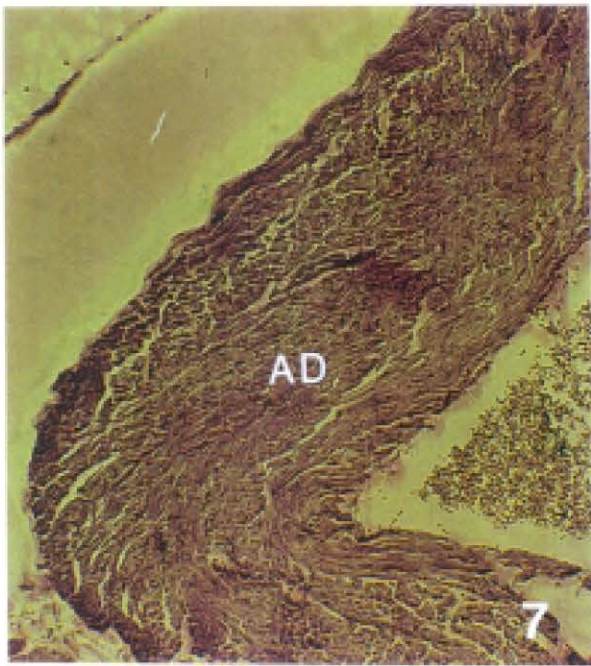
10.- Detalle de la imagen anterior H/E (20 x).

11.- Aorta a nivel medio. H/E (20 x).

12.- Detalle de la imagen anterior. H/E (40 x).

13.- Arteria pulmonar. H/E (20 x).

14.- Miocardio de VI. H/E (20 x).



II) PATRON DE DISTRIBUCION MORFOLOGICA DE NEUROPEPTIDOS EN EL CORAZON.

Vamos a describir los resultados obtenidos en nuestro trabajo atendiendo al siguiente orden:

- Sistema de conducción.
- Paredes del corazón.
- Arterias coronarias.
- Grandes vasos.

Al final de este apartado se muestran una serie de representaciones esquemáticas de la distribución diferencial de SP, NPY y VIP en las distintas zonas del corazón.

1) SISTEMA DE CONDUCCION.

En todos los corazones de los animales estudiados se demuestra una densa inervación por fibras nerviosas SP-IR en el sistema de conducción desde el nodo sinoauricular (SA) a las ramas derecha e izquierda del haz auriculoventricular (AV).

En el **NODO SA**, observamos una alta densidad de inervación por fibras nerviosas SP-IR. Los terminales nerviosos SP-IR aparecen como estructuras únicas, aisladas, con morfología tanto lineal como varicosa (Figs. 1 y 2). Las fibras son finas y

con inmunorreactividad intensa. Se distribuyen alrededor de la arteria central del nodo y entre las células musculares nodales estableciendo, en ocasiones, contacto con las mismas. En la pared auricular próxima al nodo, también se identifican fibras nerviosas SP-IR lineales y entre las fibras musculares (Fig. 3). La inervación decrece en intensidad hacia la pared auricular adyacente.

Asimismo, la inervación del **NODO SA** por fibras nerviosas NPY-IR es muy densa y superior a la de SP. Numerosas fibras nerviosas discurren en la parte central del nodo, próximas a la arteria nodal y a las células musculares (Fig. 4). Su apariencia es varicosa y de mayor grosor que la observada para SP. No obstante, en la pared de la aurícula derecha próxima al nodo, se identifica también una inmunorreactividad muy intensa para NPY y similar a la del nodo SA.

Por el contrario, la inervación del **NODO SA** por fibras nerviosas VIP-IR es mucho menor que la observada para los otros dos péptidos anteriores. En todos los corazones estudiados para demostrar la existencia de fibras nerviosas VIP-IR relacionadas con el nodo SA, la densidad de inervación es muy escasa, no pudiendo identificar fibras nerviosas en contacto con la arteria central del nodo ni con las células musculares nodales (Figs. 5 y 6). En varias preparaciones, la densidad de inervación VIP-IR del nodo SA es semejante a la de la pared auricular adyacente.

Respecto al **SEPTUM INTERAURICULAR**, observamos la existencia de muy pocas fibras nerviosas SP-IR, muy delgadas, entre las células musculares de la pared del

septum y sin presentar orientación especial. La distribución es homogénea y no se identifican acúmulos de fibras ni cuerpos celulares (Figs. 7 a 9).

También la densidad de fibras nerviosas NPY-IR en el **SEPTUM INTERAURICULAR** es muy escasa. Únicamente en las partes distales del mismo, cercanas al nodo AV, se identifican con frecuencia fibras largas aisladas, cercanas al endocardio, y con dirección paralela al eje mayor del septum (Fig. 10).

Por el contrario, la innervación del **SEPTUM INTERAURICULAR** por fibras VIP-IR parece ser más densa que por los otros dos péptidos, identificando fibras largas y ramificadas entre las fibras musculares aunque sin establecer íntimo contacto con ellas (Figs. 11 y 12). Demostramos fibras nerviosas VIP-IR tanto a nivel proximal como distal del septum (Fig. 13).

Aunque la inervación del septum interauricular por fibras SP-IR es muy escasa, a medida que nos acercamos al **NODO AV**, la densidad de inervación SP-IR aumenta. No obstante, siempre es menor que la del nodo SA en todos los corazones estudiados (Fig. 14). Las fibras discurren en la zona central del nodo AV, entre las fibras musculares y sin aparente contacto directo con las mismas. Presentan aspecto puntiforme, semejantes a terminaciones libres no especializadas.

Del mismo modo, identificamos finas fibras nerviosas NPY-IR en la zona del **NODO AV**, con aspecto lineal y puntiforme. La densidad de inervación, al igual que para el nodo SA, es mayor que para SP (Fig. 15).

La inervación del **NODO AV** por fibras nerviosas VIP-IR es moderadamente densa y siempre menor que la de los dos neuropéptidos previos. Su distribución es homogénea y en diversas preparaciones parecer contactar con las células musculares nodales (Fig. 16).

La mayor densidad de fibras NPY-IR en el sistema de conducción se observa en el **HAZ AURICULOVENTRICULAR (AV)**. Las fibras son largas, gruesas, dispuestas paralelas y entre las fibras musculares con una inmunofluorescencia muy intensa (Figs. 17 y 18). Su distribución es heterogénea con acúmulos de fibras nerviosas NPY-IR localizados en zonas concretas. En otros lugares del haz AV, las fibras fueron son delgadas y con inmunorreactividad débil; incluso en algunos de los corazones estudiados, los acúmulos de gruesas fibras alternan con zonas no inmunorreactivas.

La inervación del **HAZ AV** por fibras nerviosas SP-IR es claramente diferente de la hallada para NPY. Observamos una densa inervación por fibras nerviosas SP-IR delgadas y puntiformes entre las células musculares del haz y con distribución homogénea (Fig. 19).

La inervación por fibras nerviosas VIP-IR en el **HAZ AV** es moderadamente densa. Las fibras, al igual que con SP, muestran una inmunorreactividad con distribución homogénea (Fig. 20). En alguna preparación, observamos acúmulos aislados de estructuras VIP-IR intensamente inmunofluorescentes en las partes iniciales del haz (Fig. 21).

En cuanto a las **RAMAS DEL HAZ**, objetivamos fibras nerviosas SP-IR en la parte proximal de la rama derecha (Fig. 22) y de la izquierda (Figs. 23 y 24). Alternan fibras finas y alargadas con otras puntiformes. No obstante, también se identifica una densa inervación, incluso mayor que a nivel proximal, por fibras SP-IR y en contacto con las fibras de Purkinje (Fig. 25).

La inervación de las **RAMAS DEL HAZ** por fibras NPY-IR es más densa que para SP. Numerosas fibras nerviosas se identifican entre las células musculares de las ramas derecha e izquierda del haz (Fig. 26), tanto a nivel proximal como distal (Figs. 27 a 29). Estas fibras son, generalmente, muy largas y paralelas a las fibras de Purkinje (Fig. 30).

A diferencia de los dos neuropéptidos anteriores, la inervación por VIP de las **RAMAS DEL HAZ** es muy escasa. Solamente en alguna preparación se identifican fibras nerviosas VIP-IR entre las fibras musculares (Figs. 31 a 33).

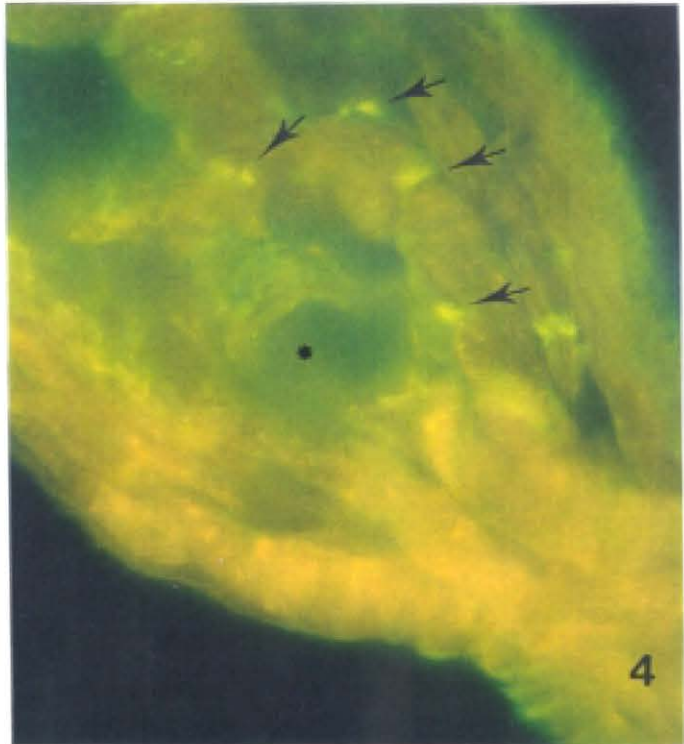
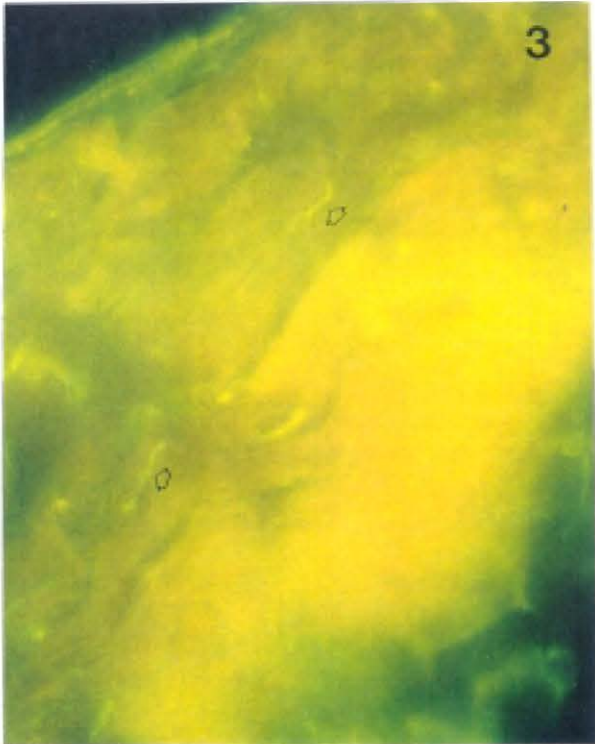
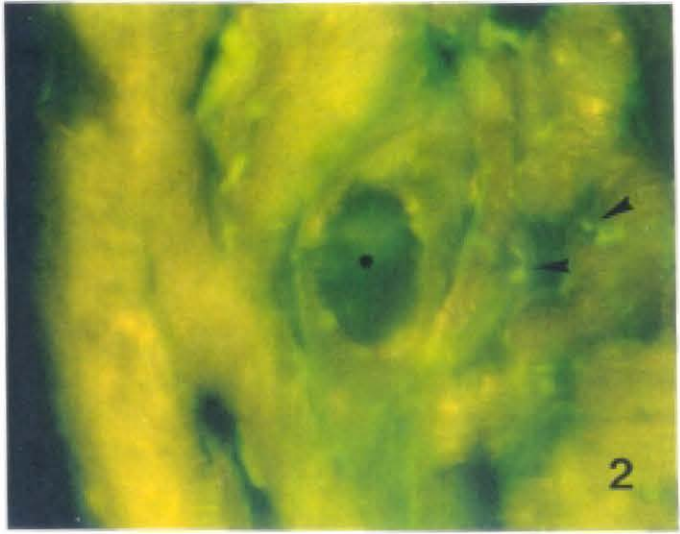
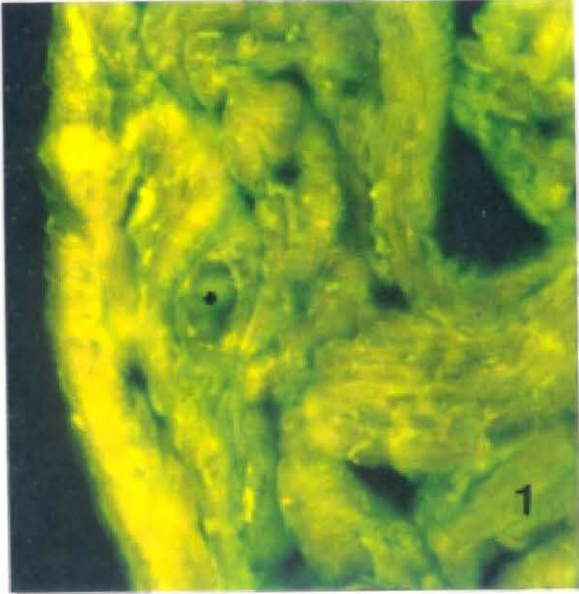
SISTEMA DE CONDUCCION

Fig. 1. SP. Corte longitudinal a nivel del nodo SA donde se observan fibras nerviosas SP-IR en contacto con las células nodales y alrededor de la arteria central del nodo (asterisco: arteria central del nodo) (20 x).

Fig. 2. SP. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 3. SP. Pared de AD próxima al nodo SA con inmunotinción positiva (flechas) (40 x).

Fig. 4. NPY. Sección longitudinal a nivel del nodo SA con positividad para NPY (flechas) (40 x).



SISTEMA DE CONDUCCION

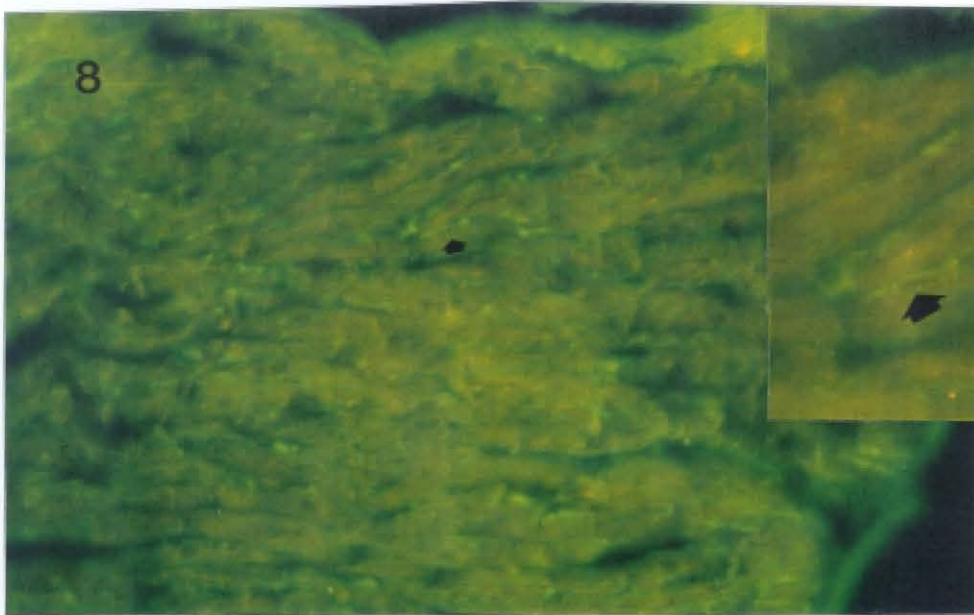
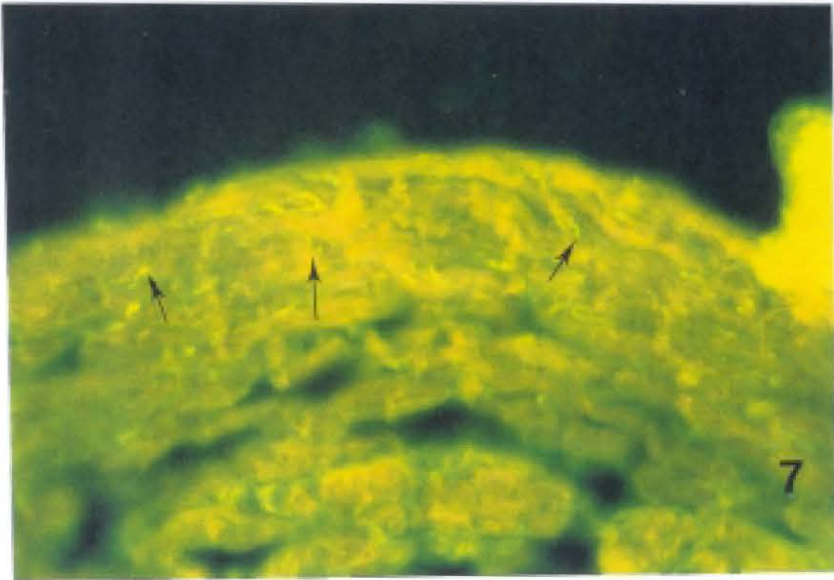
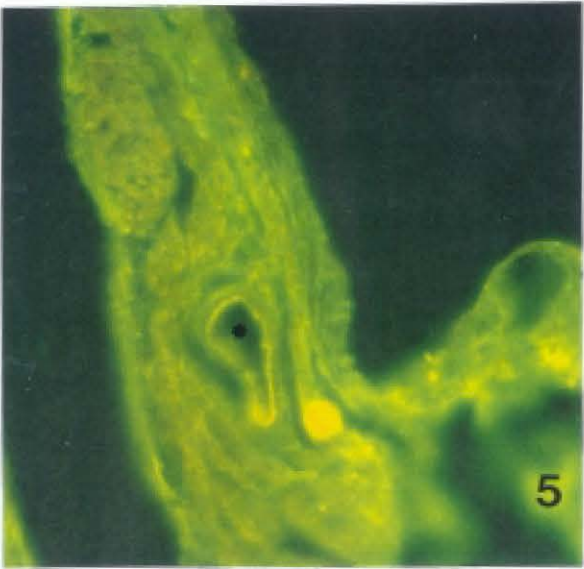
Fig. 5. VIP. Ausencia de fibras nerviosas VIP-IR en el nodo SA (asterisco: arteria central del nodo) (20 x).

Fig. 6. VIP. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 7. SP. Septum interauricular. Escasas fibras nerviosas SP-IR en su porción superior (flechas) (20 x).

Fig. 8. SP. Baja densidad de fibras nerviosas SP-IR en el septum interauricular sin orientación especial (20 x).

Fig. 9. SP. Detalle de la imagen anterior (flecha) (40 x).

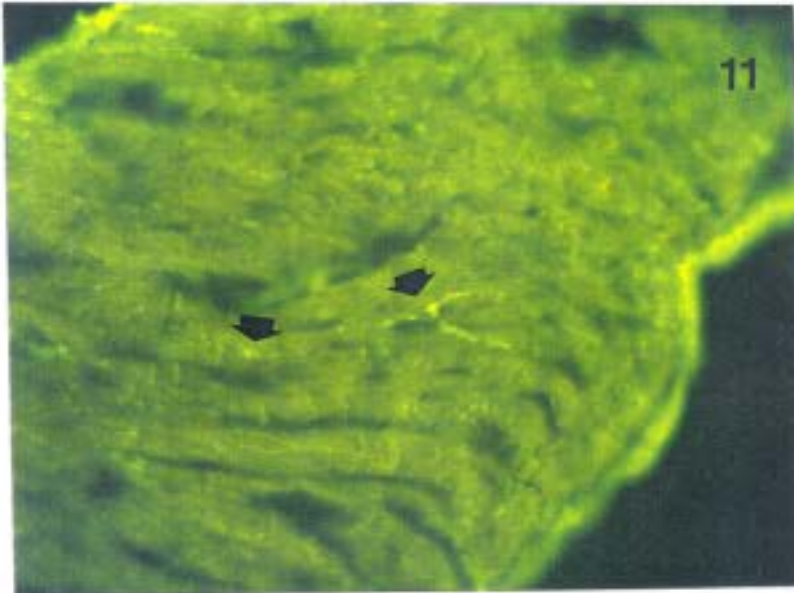
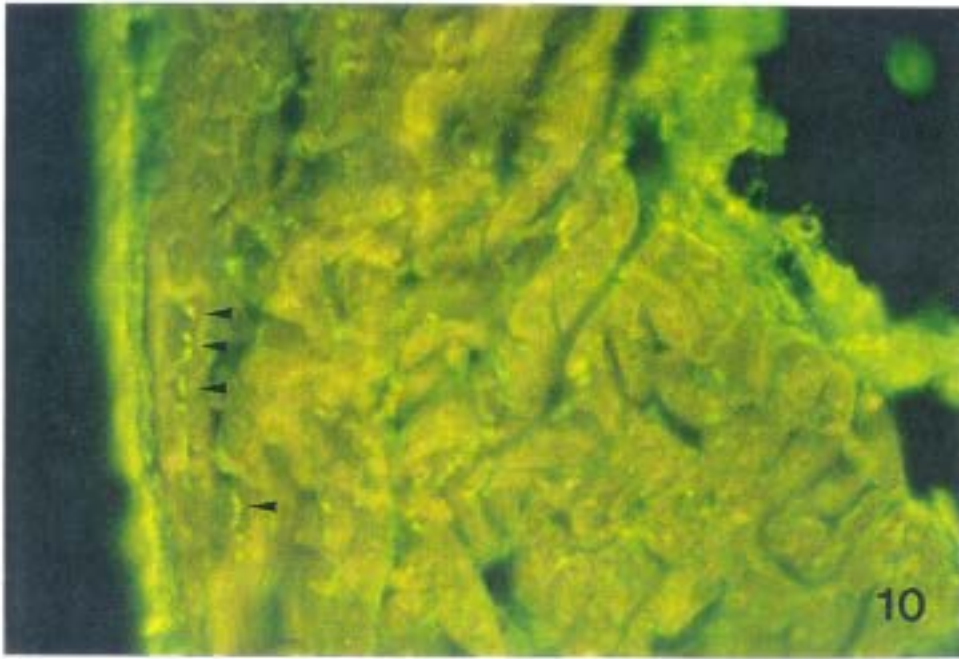


SISTEMA DE CONDUCCION

Fig. 10. NPY. Fibras nerviosas NPY-IR dispersas en la porción distal del septum interauricular (flechas) (20 x).

Fig. 11. VIP. Septum interauricular. Gruesas fibras nerviosas VIP-IR con inmunorreactividad intensa (flechas) (20 x).

Fig. 12. VIP. Detalle de la imagen anterior (40 x).

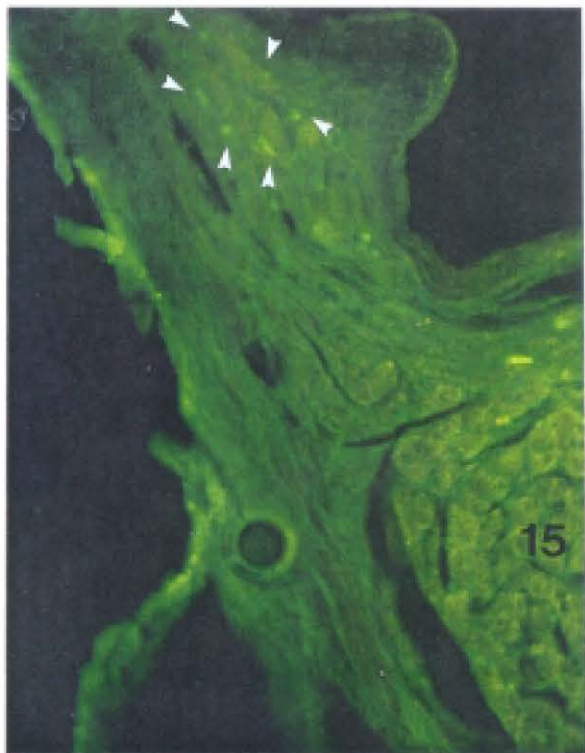
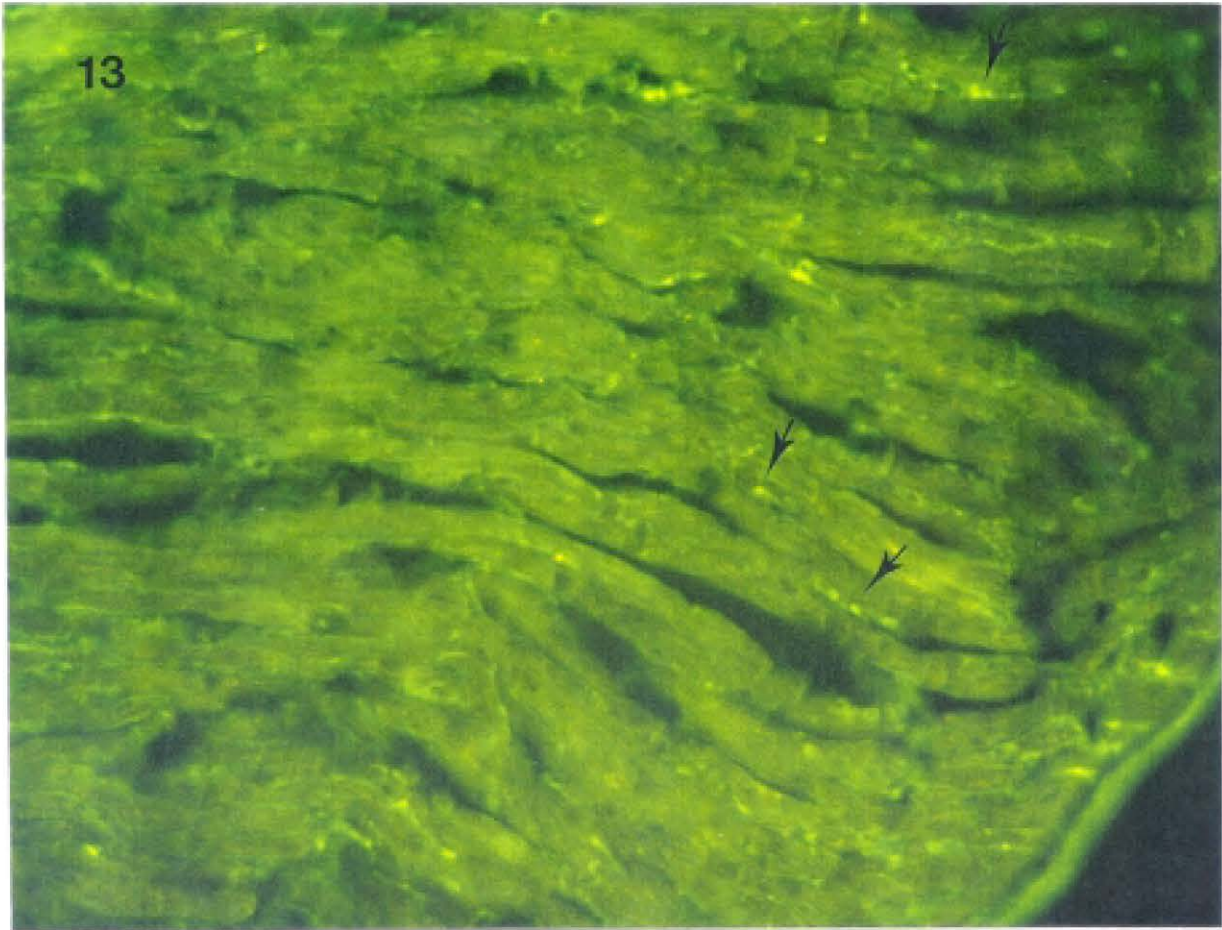


SISTEMA DE CONDUCCION

Fig. 13. VIP. Septum interauricular. Corte longitudinal a nivel distal mostrando numerosas fibras nerviosas VIP-IR (flechas) (20 x).

Fig. 14. SP. Nodo AV positivo (flechas) (20 x).

Fig. 15. NPY. Nodo AV positivo (flechas) (20 x).

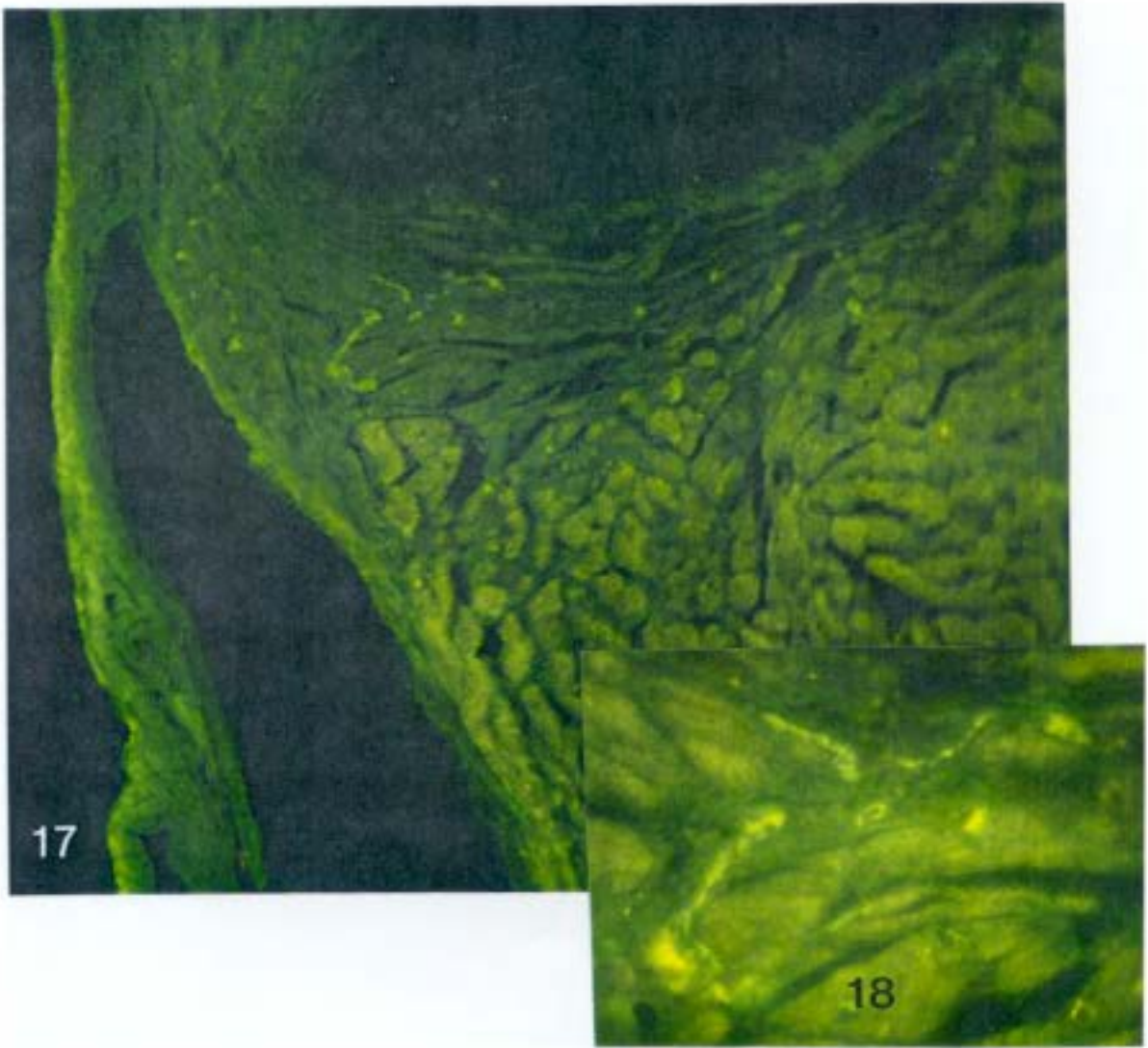
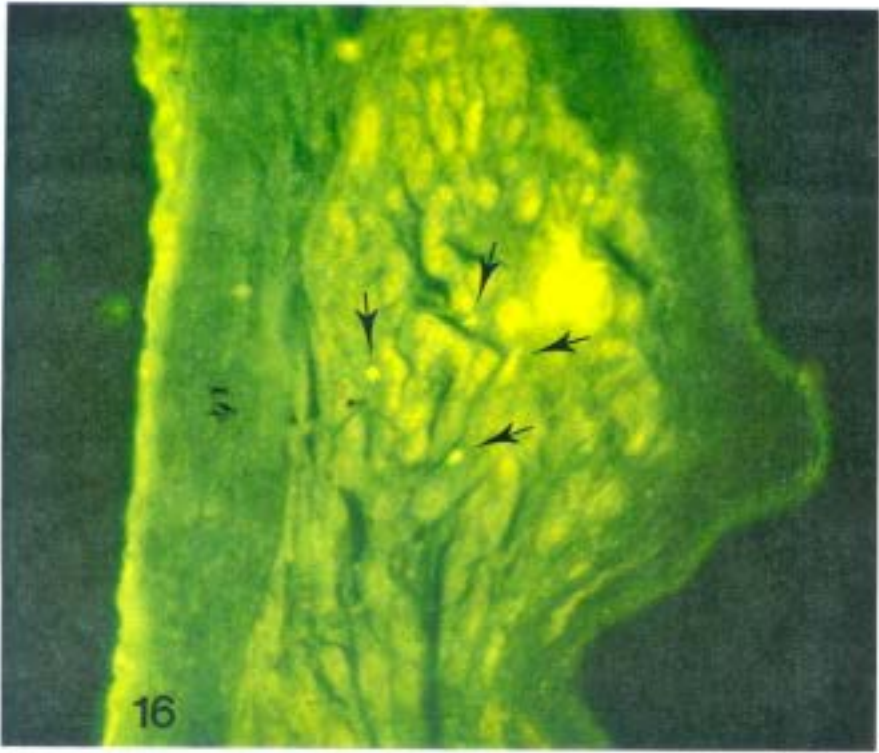


SISTEMA DE CONDUCCION

Fig. 16. VIP. Nodo AV positivo (flechas) (20 x).

Fig. 17. NPY. Alta densidad de inervación NPY-IR en el haz AV con distribución heterogénea (20 x).

Fig. 18. NPY. Detalle de la imagen anterior (40 x).

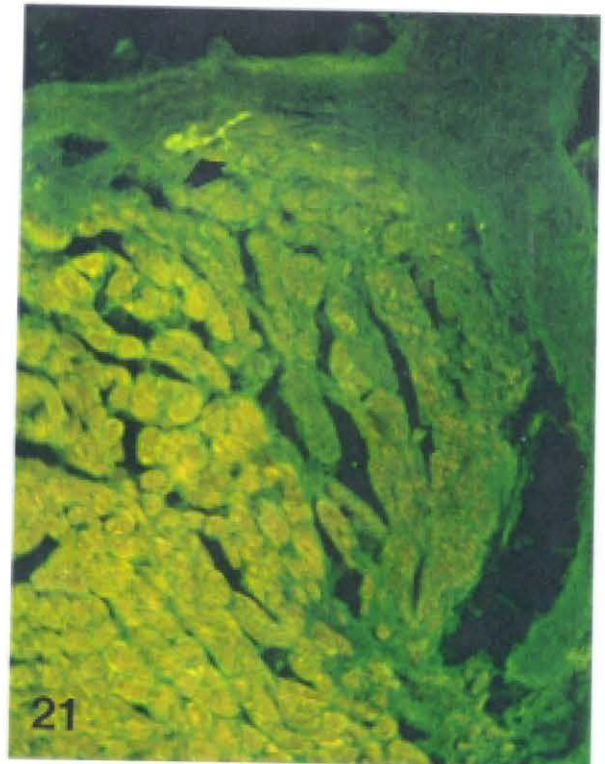
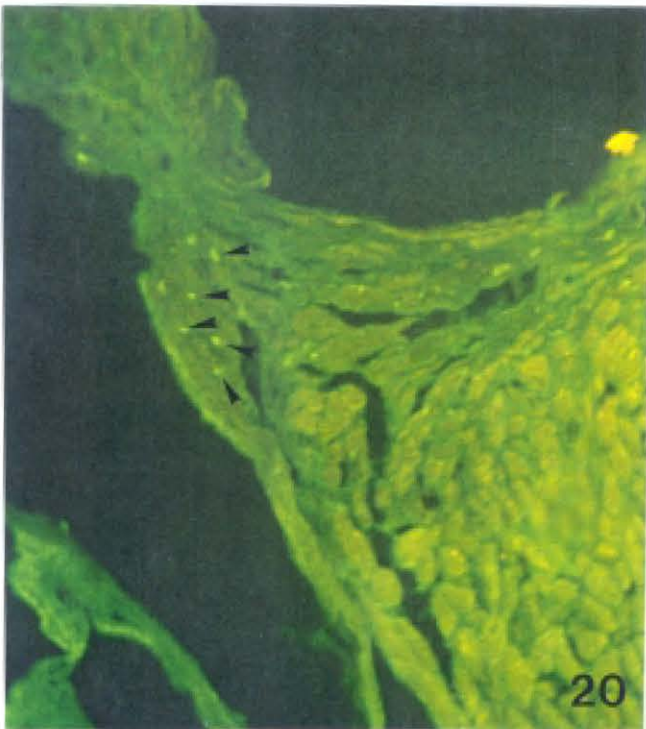
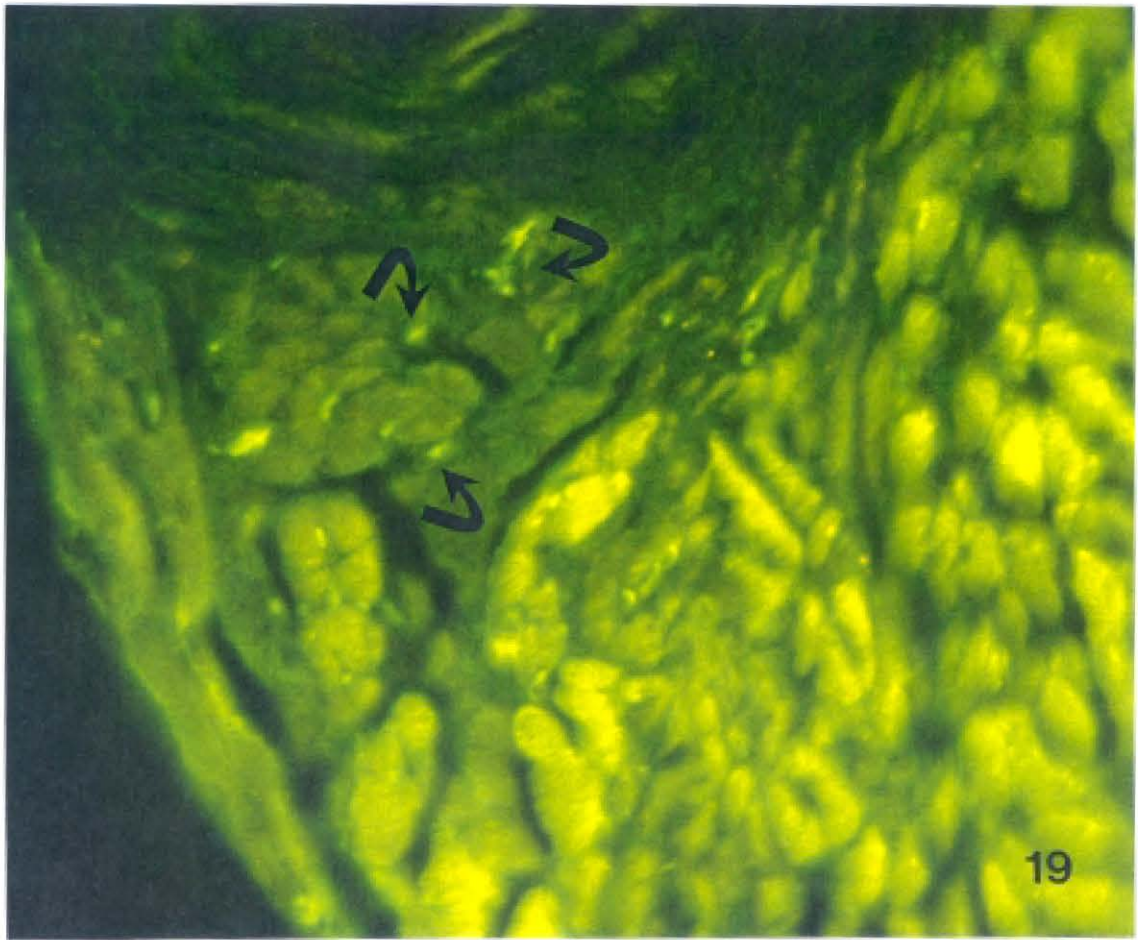


SISTEMA DE CONDUCCION

Fig. 19. SP. Alta densidad de inervación en haz AV por fibras nerviosas SP-IR en íntimo contacto con el tejido de conducción (flechas) (20 x).

Fig. 20. VIP. Haz AV positivo (flechas) (20 x).

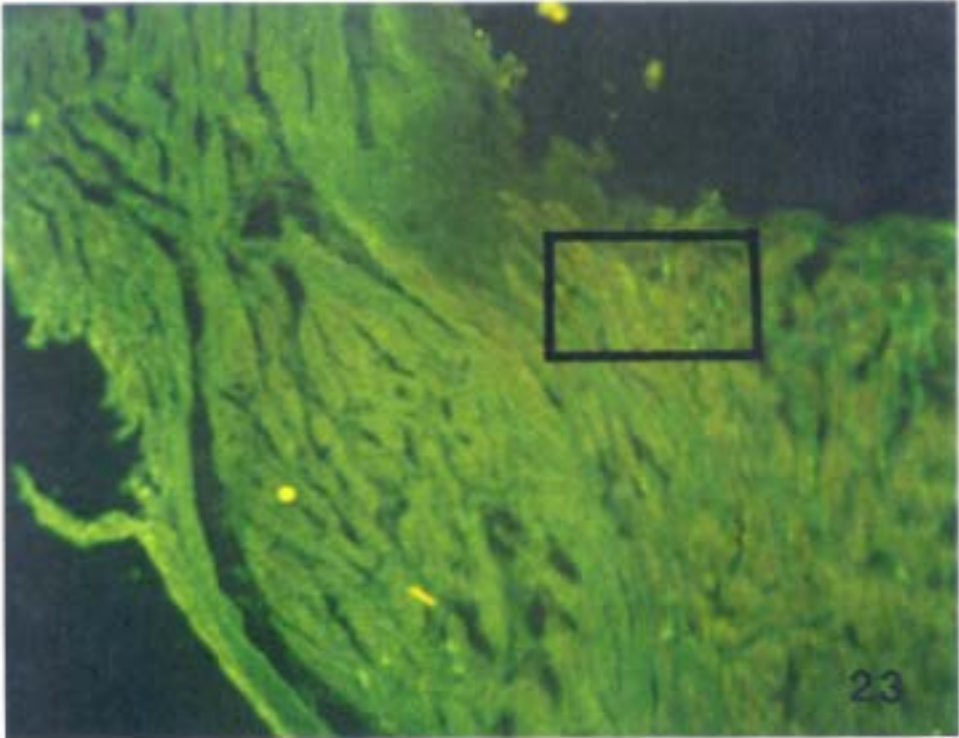
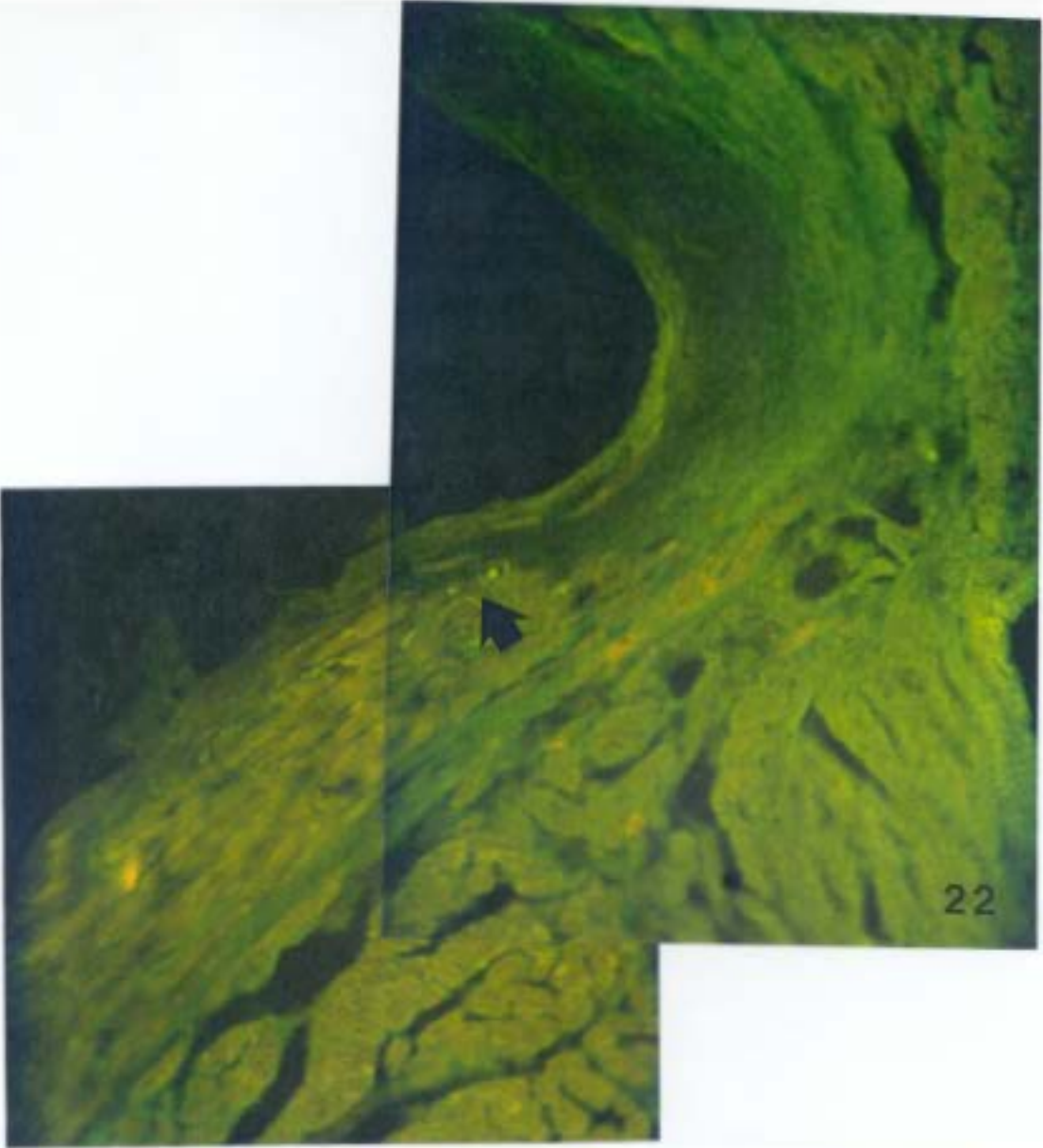
Fig. 21. VIP. Acúmulo aislado de material VIP-IR en la porción inicial del haz (flecha) (20 x).



SISTEMA DE CONDUCCION

Fig. 22. SP. Fotomontaje que muestra la rama derecha del haz positiva para SP (flecha) (20 x).

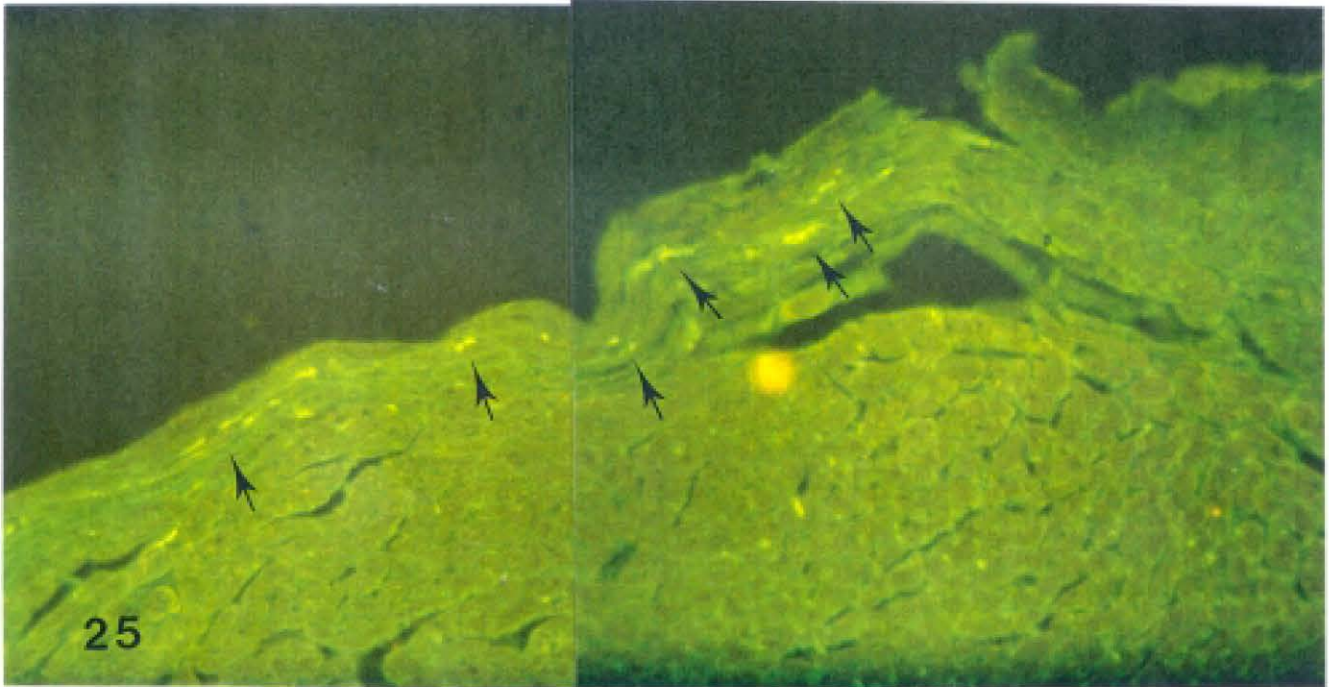
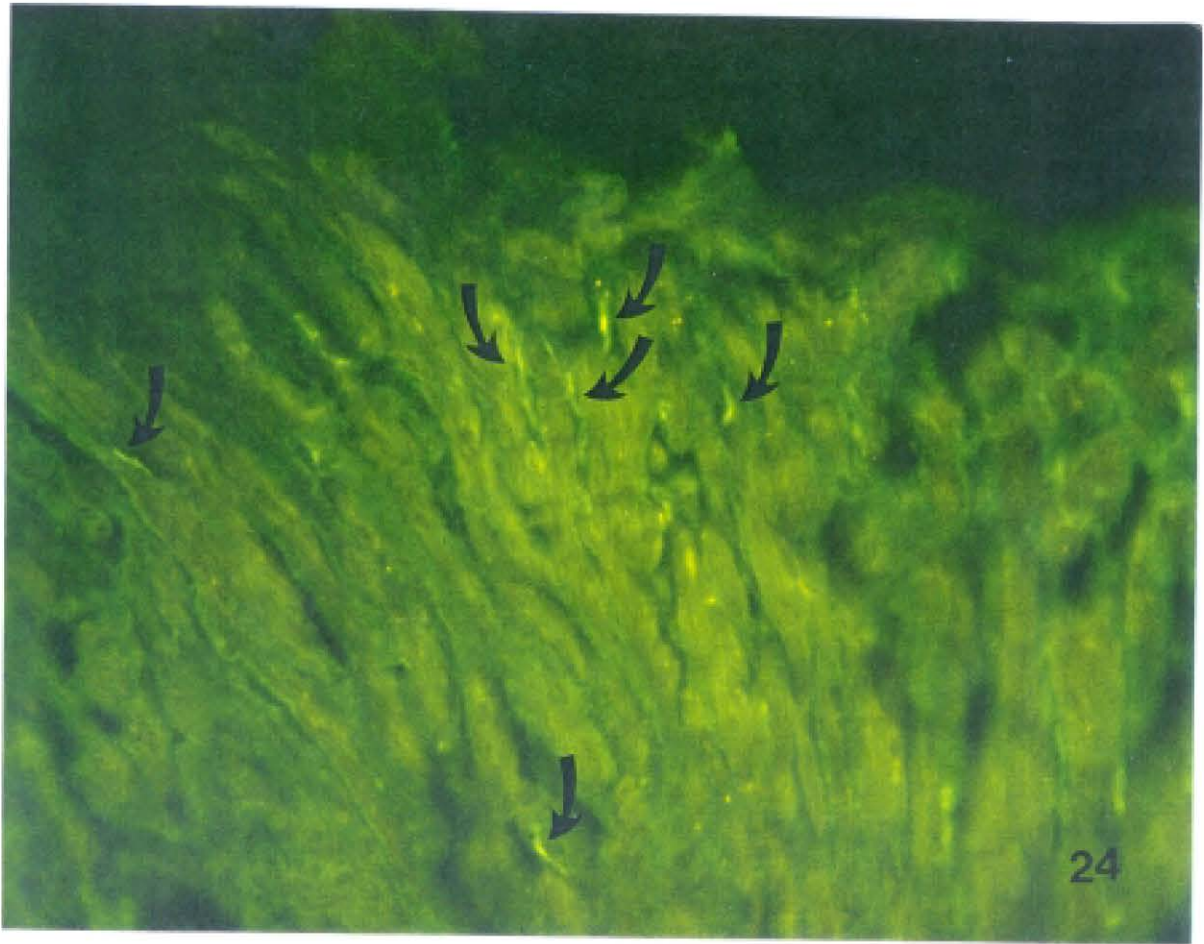
Fig. 23. SP. Rama izquierda positiva. En el recuadro se muestra la zona ampliada en la figura siguiente (20 x).



SISTEMA DE CONDUCCION

Fig. 24. SP. Detalle de la imagen anterior. Las flechas señalan la existencia de fibras nerviosas SP-IR (40 x).

Fig. 25. SP. Alta densidad de inervación por fibras nerviosas SP-IR a nivel de la porción distal de la rama derecha del haz (flechas) (20 x).

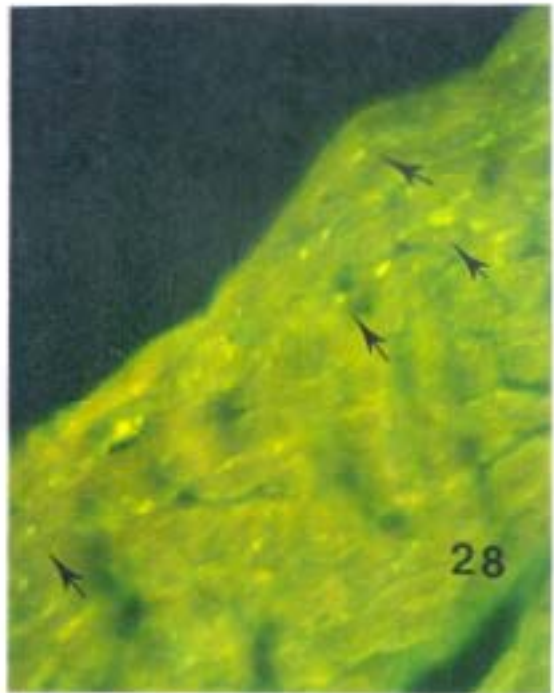
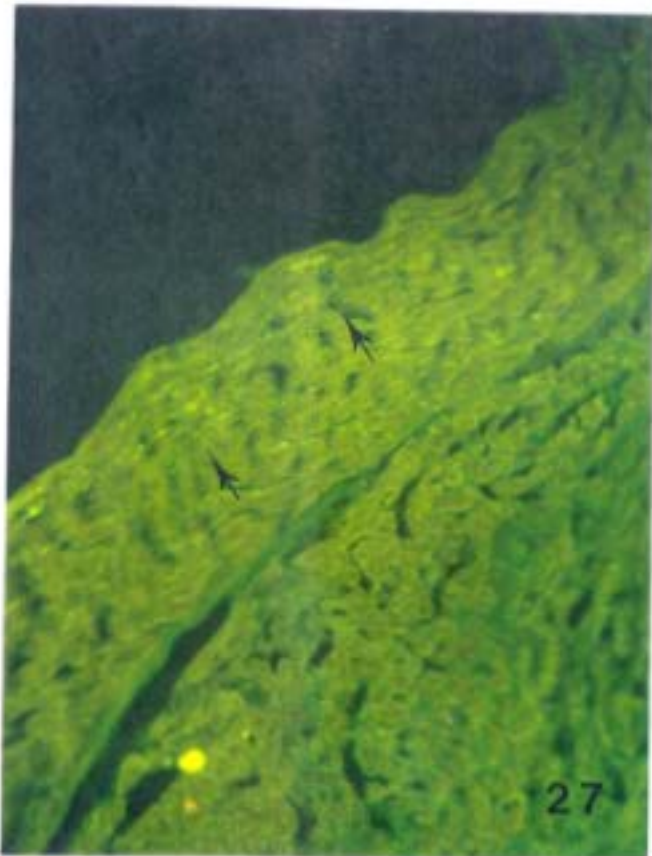
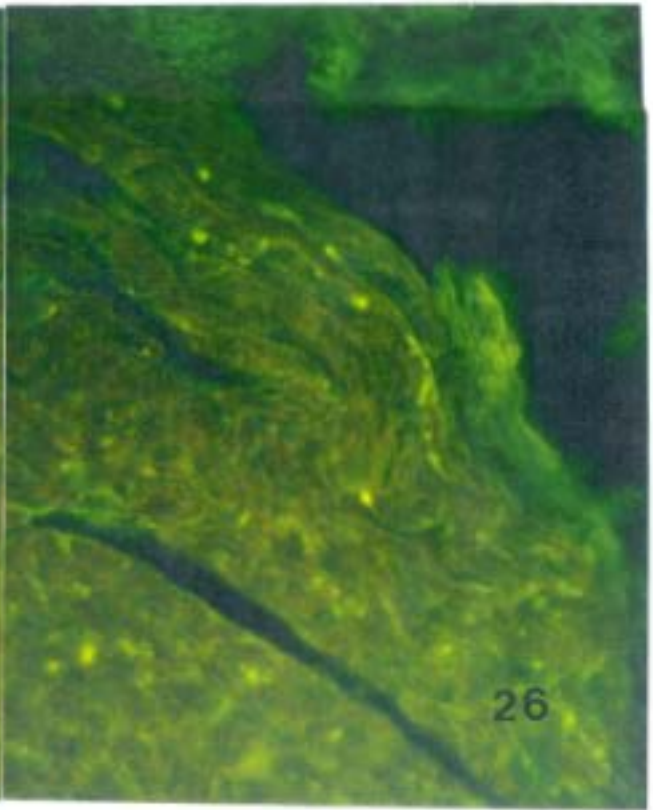
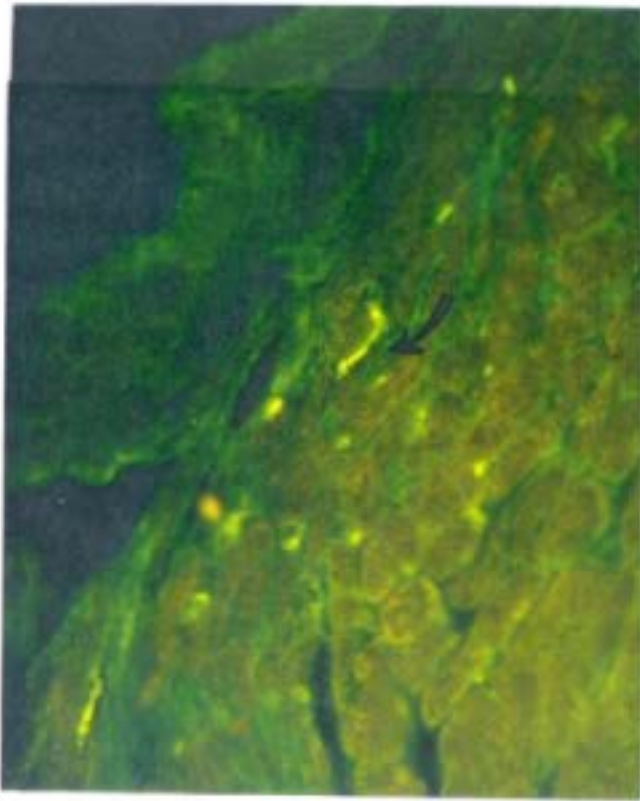


SISTEMA DE CONDUCCION

Fig. 26. NPY. Corte longitudinal a nivel del septum interventricular que muestra numerosas fibras nerviosas NPY-IR en la porción inicial de las ramas derecha e izquierda del haz. La flecha señala una gruesa fibra nerviosa NPY-IR (40 x).

Fig. 27. NPY. Rama derecha a nivel proximal positiva para NPY (flechas) (20 x).

Fig. 28. NPY. Detalle de la imagen anterior (40 x).



SISTEMA DE CONDUCCION

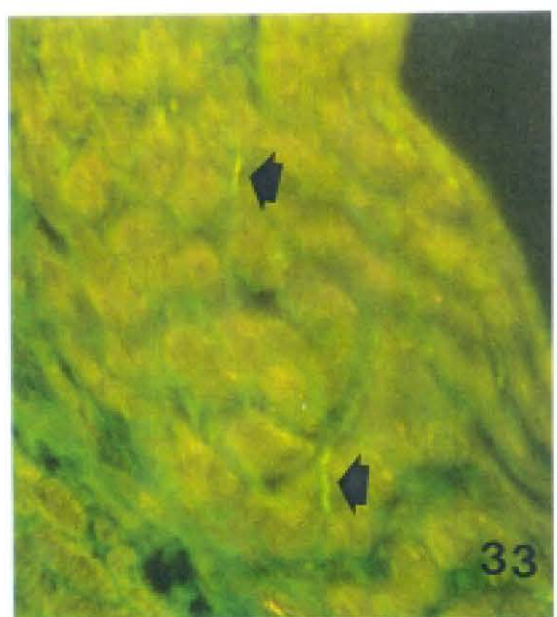
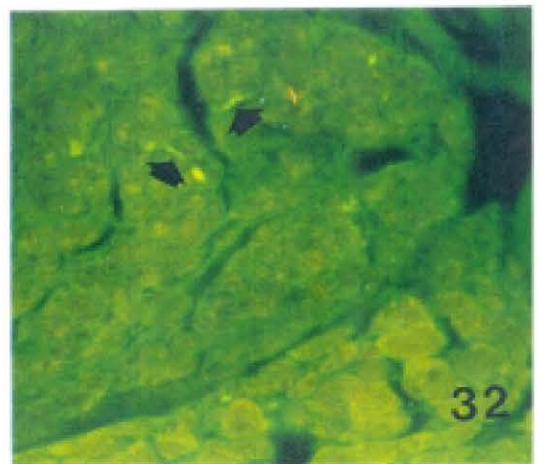
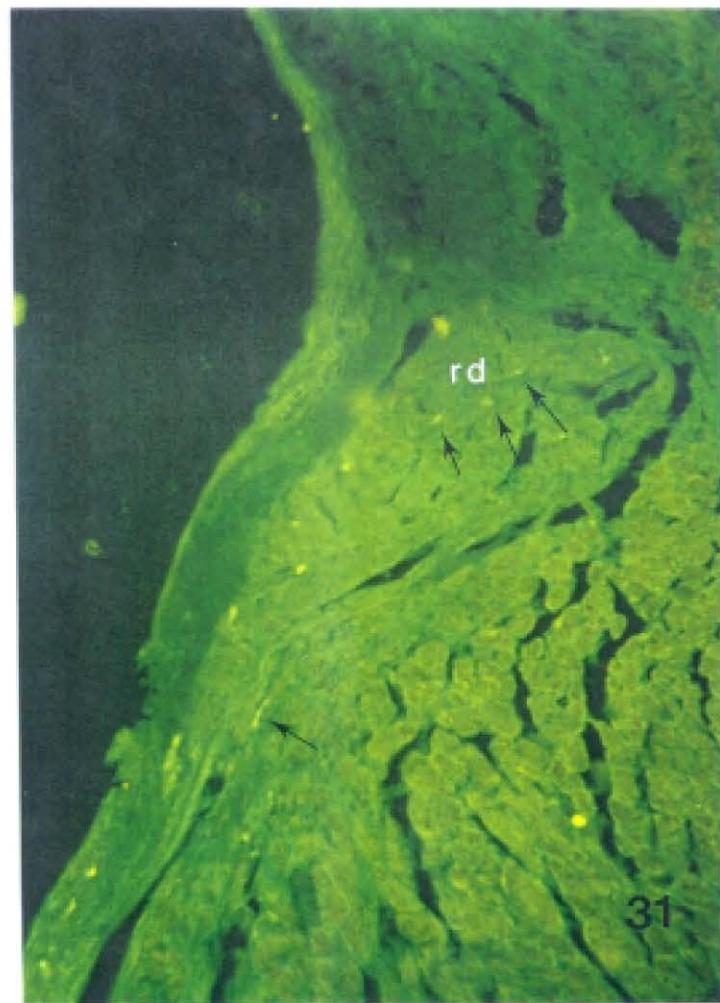
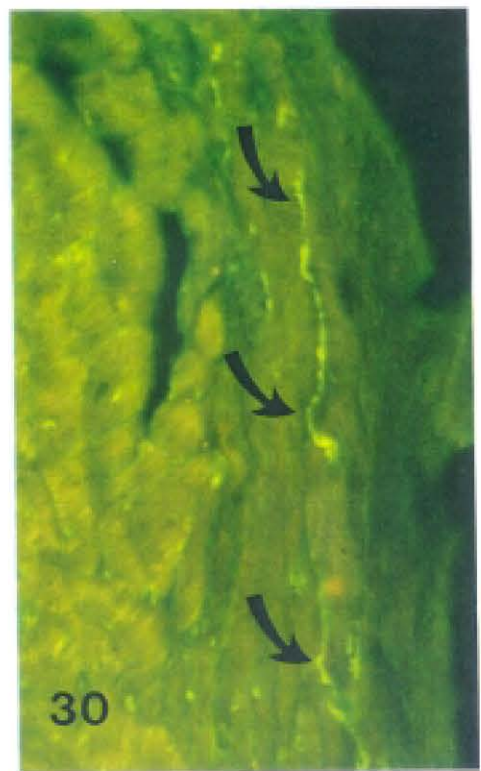
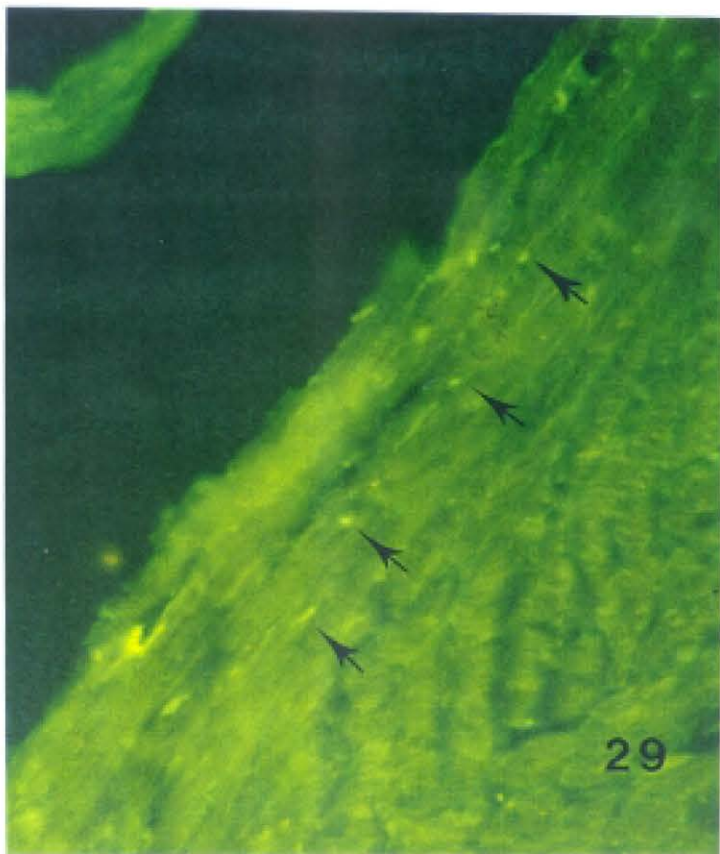
Fig. 29. NPY. Rama derecha a nivel distal (flechas: fibras nerviosas NPY-IR) (40 x).

Fig. 30. NPY. Rama izquierda del haz AV. Fibras nerviosas NPY-IR largas y paralelas a las fibras de Purkinje (flechas) (40 x).

Fig. 31. VIP. Porción inicial de la rama derecha (rd) del haz con baja densidad de innervación VIP-IR (flechas) (20 x).

Fig. 32. VIP. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 33. VIP. Fibras nerviosas VIP-IR (flechas) entre las fibras musculares de la rama derecha del haz (40 x).



2) PAREDES DEL CORAZON.

En la pared del VENTRICULO IZQUIERDO (VI), la mayor densidad de inervación SP-IR se identifica a nivel de subendocardio, fundamentalmente en la zona de inserción de la válvula Mitral (Figs. 34 y 35) y zonas adyacentes. En el endocardio del VI próximo al ápex, las fibras nerviosas SP-IR son muy escasas o inexistentes. No observamos fibras SP-IR en el espesor de la pared miocárdica (Fig. 36). La densidad de inervación SP-IR a nivel subepicárdica es muy pequeña con fibras puntiformes escasas tanto a nivel proximal como distal (Figs. 37 y 38). No obstante, en la región del surco AV, la inervación SP-IR subepicárdica es abundante tanto en aurícula como en ventrículo (Fig. 39).

En el VENTRICULO DERECHO (VD), la disposición de las fibras SP-IR es semejante, con fibras en la zona de inserción de la válvula Tricúspide (Figs. 40 y 41). No se observan fibras SP-IR en miocardio (Fig. 42) y sí en epicardio (Fig. 43).

En cuanto a NPY, observamos una densidad semejante de inervación subendocárdica en el VI a la encontrada para SP y con distribución similar. También la mayor densidad de fibras NPY-IR se identifica en la zona de inserción de la válvula Mitral (Fig. 44). Estas fibras nerviosas se sitúan en los canales de tejido conectivo existente entre las células musculares e íntimamente relacionadas con las mismas. En el espesor de la pared miocárdica del VI también se demuestra la existencia de una moderada a alta densidad de inervación por fibras NPY-IR a modo de un punteado

uniforme y en ocasiones fibras delgadas más largas con dilataciones varicosas (Figs. 45 y 46). No se observan grandes troncos nerviosos ni cuerpos celulares. La inervación NPY-IR subepicárdica es mayor que la de SP; las fibras discurren paralelas a las fibras musculares pareciendo, en ocasiones, contactar con ellas (Fig. 47). La inervación es muy densa en subepicardio en la zona próxima a las arterias coronarias.

En **VD**, también en la zona subendocárdica próxima a la inserción de la válvula Tricúspide se identifican finas fibras nerviosas NPY-IR (Fig. 48). En miocardio de VD, observamos en diversas preparaciones fibras largas y acúmulos ocasionales con dilataciones varicosas (Fig. 49).

En lo que respecta a la inervación del neuropéptido VIP de las paredes cardíacas, observamos una clara diferencia entre la inervación de aurículas y ventrículos. En ambos ventrículos, sólo encontramos fibras nerviosas VIP-IR en la zona de inserción de las válvulas Mítral y Tricúspide (Fig. 50). En la zona subepicárdica, próxima a las arterias coronarias, la densidad de inervación por fibras VIP-IR es muy pequeña con claras diferencias respecto a la inervación por SP y NPY. No observamos ninguna fibra VIP-IR en el espesor de la pared miocárdica ni de VI ni de VD.

En este estudio, tomamos como referencia el **MUSCULO PAPILAR SEPTAL** para valorar la existencia de inervación peptidérgica a dicho nivel. Numerosas fibras NPY-IR inervan el músculo papilar en toda su extensión con fibras finas y alargadas entre las fibras musculares (Fig. 51). También se identifican fibras nerviosas SP-IR,

aunque en mucho menor número y con aspecto puntiforme (Fig. 52). Por el contrario, no se identifican fibras nerviosas VIP-IR en los músculos papilares de ninguno de los corazones estudiados.

Para estudiar la innervación peptidérgica de las aurículas, se compararon ambas cámaras cardíacas con los tres neuropéptidos. En cuanto a SP, se observa una mayor densidad de innervación SP-IR en AURICULA DERECHA (AD), con fibras largas y finas alternando con fibras de apariencia puntiforme en todas las capas (Figs. 53 y 54). La innervación SP-IR de la AURICULA IZQUIERDA (AI) es moderada y menor que la de la AD pero mayor que la de ambos ventrículos (Fig. 55). No se observan estructuras que pudieran representar cuerpos celulares en ninguna zona de las paredes cardíacas.

La AD presenta una densa innervación por fibras NPY-IR a nivel subepicárdico (Fig. 56), aunque fundamentalmente en la zona subendocárdica (Fig. 57). Múltiples fibras NPY-IR de gran longitud se observan en la cara posterior de la AD sin poder identificar en ningún momento cuerpos celulares nerviosos (Fig. 58). En las proximidades del nodo SA la innervación es muy densa. En cuanto a la AI, la innervación por fibras NPY-IR es mayor a nivel subepicárdico a modo de fibras delgadas y alargadas. También se identifican algunas fibras NPY-IR cercanas al endocardio y en miocardio de forma aislada. En la porción superior del septum interauricular, a nivel de la base del corazón, observamos acúmulos de estructuras NPY-IR no encontradas con el marcaje para SP (Figs. 59 y 60).

La densidad de fibras nerviosas VIP-IR en ambas aurículas es semejante y moderada. Aunque las fibras se distribuyen en todas las capas de la pared, un dato característico es la disposición de las fibras VIP-IR localizadas en zonas determinadas de las aurículas, mientras que en otras zonas, la inervación es muy escasa (Fig. 61).

INERVACION DE LAS VALVULAS CARDIACAS.

Como ya hemos expuesto, la zona de inserción de las válvulas Mitral y Tricúspide presenta una densa inervación por fibras nerviosas peptidérgicas. La mayor inervación es por fibras NPY-IR (Figs. 44 y 48) seguido por SP (Figs. 34,35,40,41).

La inervación por VIP es menos densa con fibras finas y puntiformes entre las fibras musculares del anillo valvular. No observamos inervación en las zonas de inserción de las válvulas Pulmonar ni Aórtica (Fig. 62).

Las fibras nerviosas inmunorreactivas están íntimamente asociadas con las células musculares y localizadas en el tejido conectivo existente entre las mismas (Figs. 63 y 64). A nivel de la válvula Mitral, se observan tanto fibras SP-IR como NPY-IR largas y delgadas a lo largo de toda la válvula pero sin alcanzar nunca el borde libre de la misma (Figs. 65 a 68).

PAREDES DEL CORAZON

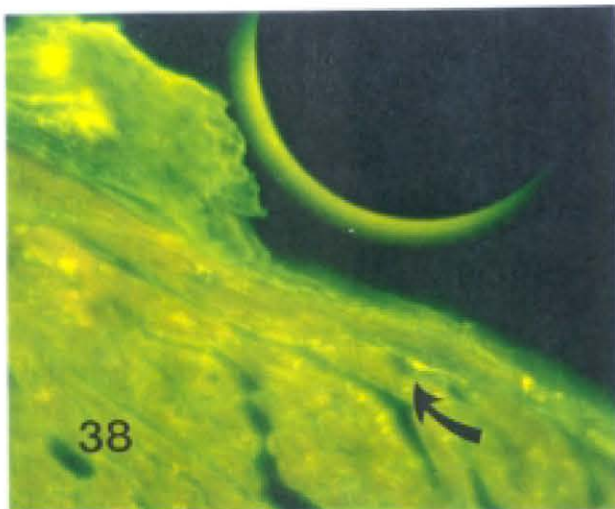
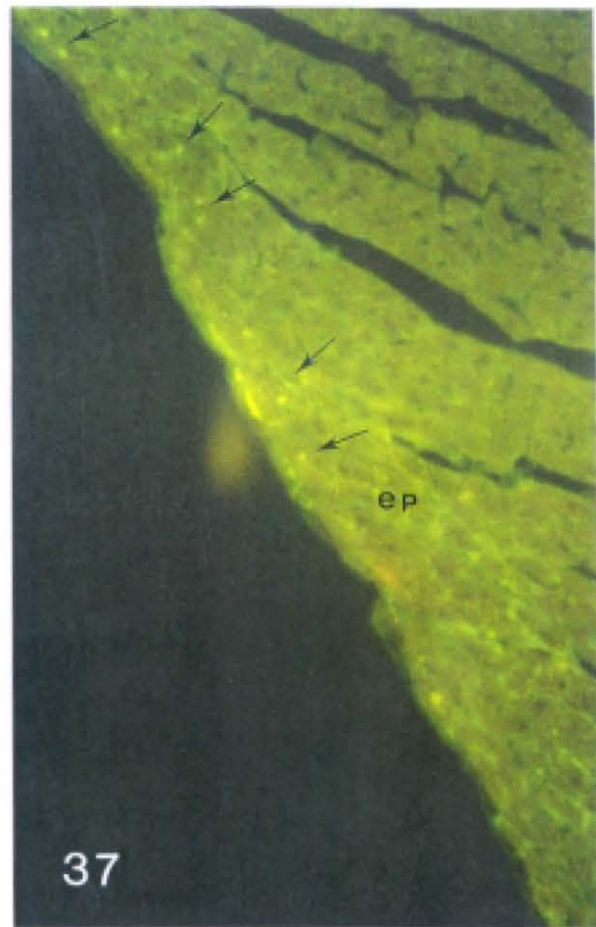
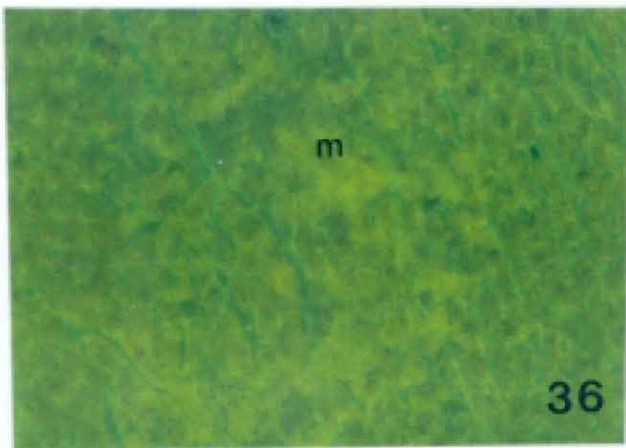
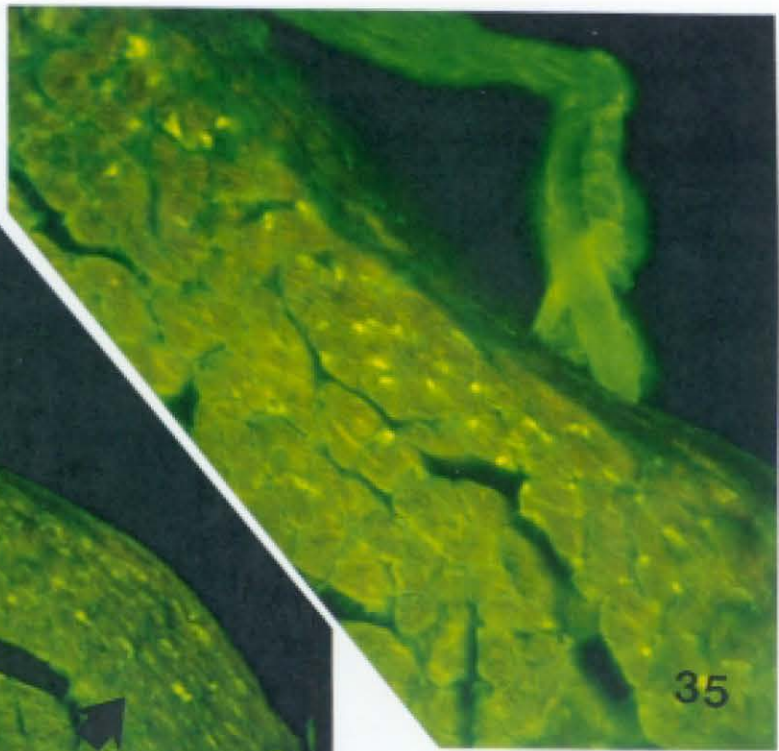
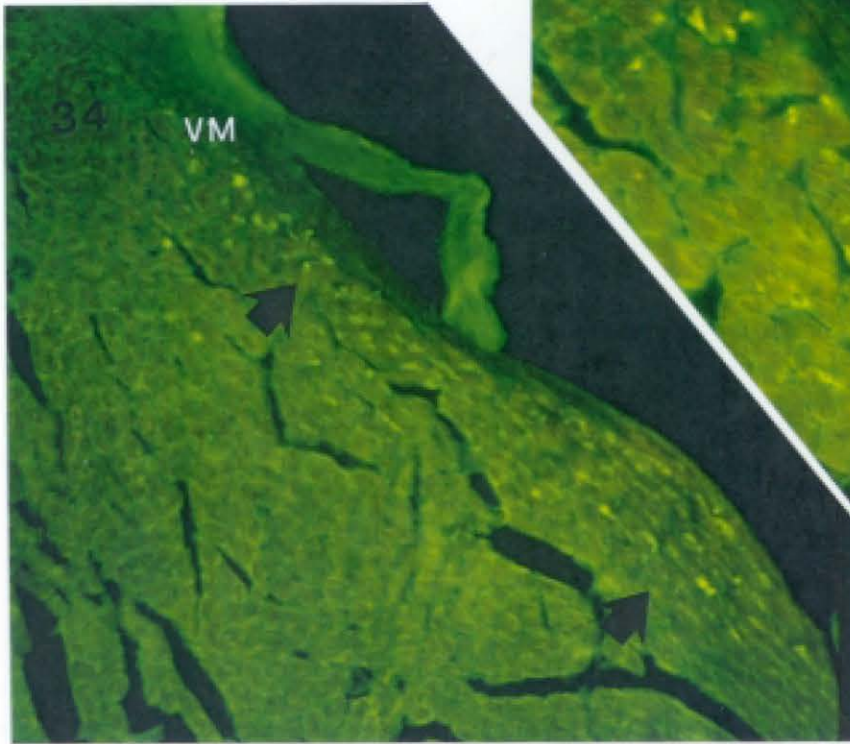
Fig. 34. SP. Ventrículo Izquierdo. Inervación por SP (flecha) nivel de la inserción de la válvula Mitral (VM) (20 x).

Fig. 35. SP. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 36. SP. Sección a nivel de miocardio (m) de VI. Negatividad para SP (20 x).

Fig. 37. SP. Corte longitudinal a nivel de VI en la zona subepicárdica cercana al ápex con fibras nerviosas aisladas SP-IR (flechas); ep: epicardio (20 x).

Fig. 38. SP. Subepicardio de VI a nivel proximal. Flecha: fibra nerviosa SP-IR (40 x).



PAREDES DEL CORAZON

Fig. 39. SP. Fibras nerviosas SP-IR subepicárdicas en la región del surco AV; A: aurícula; V: ventrículo (20 x).

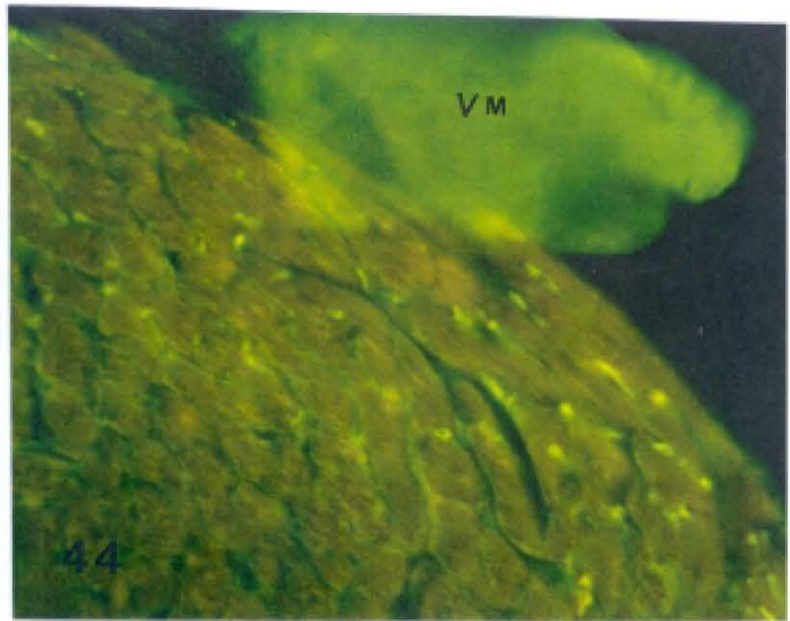
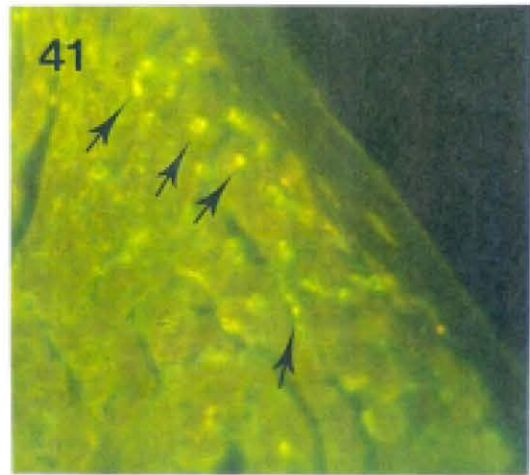
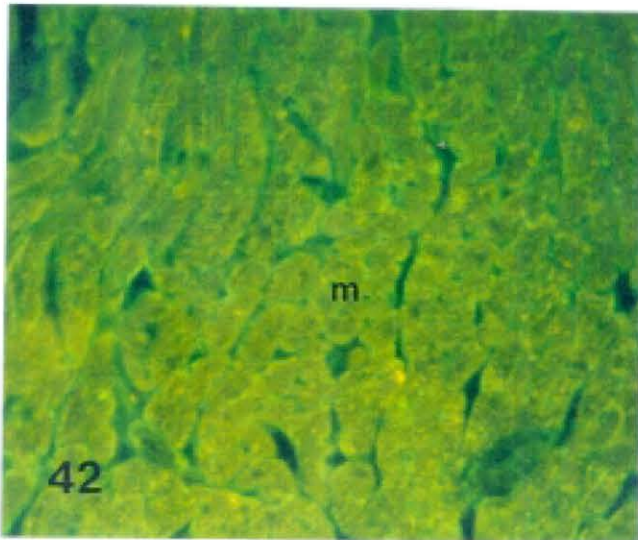
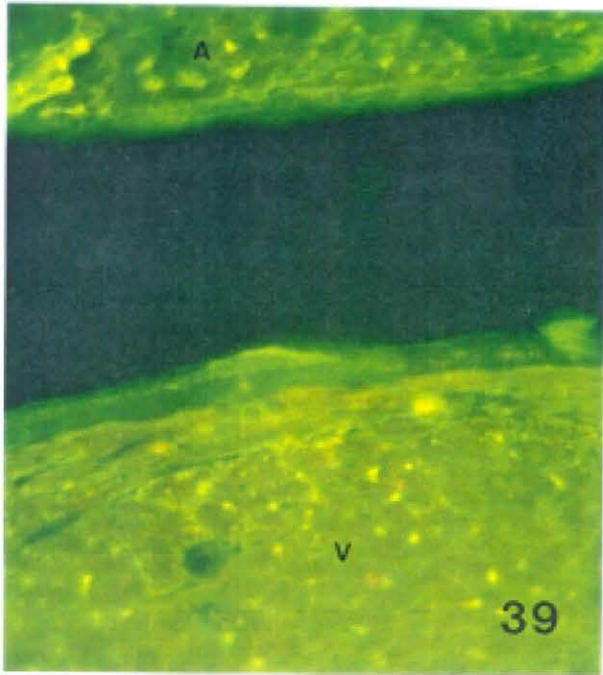
Fig. 40. SP. Ventrículo derecho. Inserción de la válvula Tricúspide (VT) positiva (flecha) (20 x).

Fig. 41. SP. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 42. SP. Ausencia de fibras nerviosas SP-IR en miocardio (m) de VD (20 x).

Fig. 43. SP. Baja densidad de inervación SP-IR en la región subepicárdica distal de VD (flechas); ep: epicardio (40 x).

Fig. 44. NPY. Ventrículo Izquierdo. Inserción de la válvula Mitral (VM) positiva para NPY (40 x).



PAREDES DEL CORAZON

Fig. 45. NPY. Miocardio de VI. Densa inervación por fibras nerviosas NPY-IR dispuestas entre las fibras musculares (flechas) (40 x).

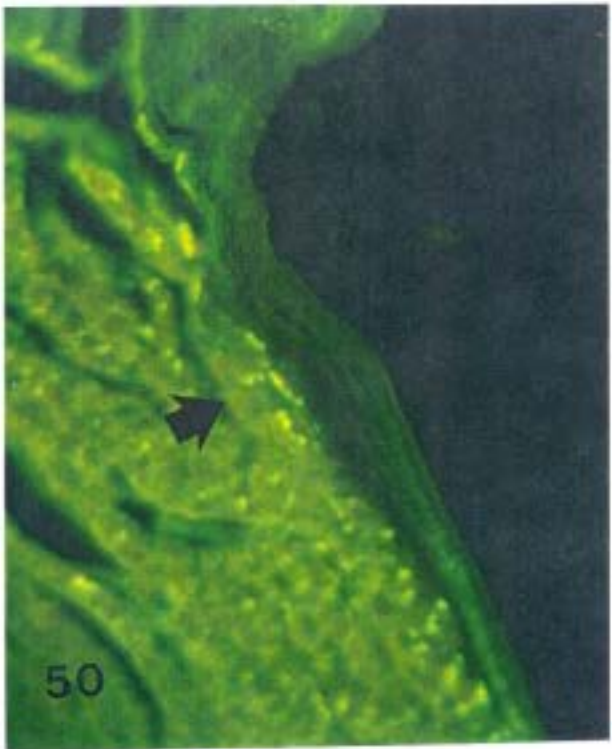
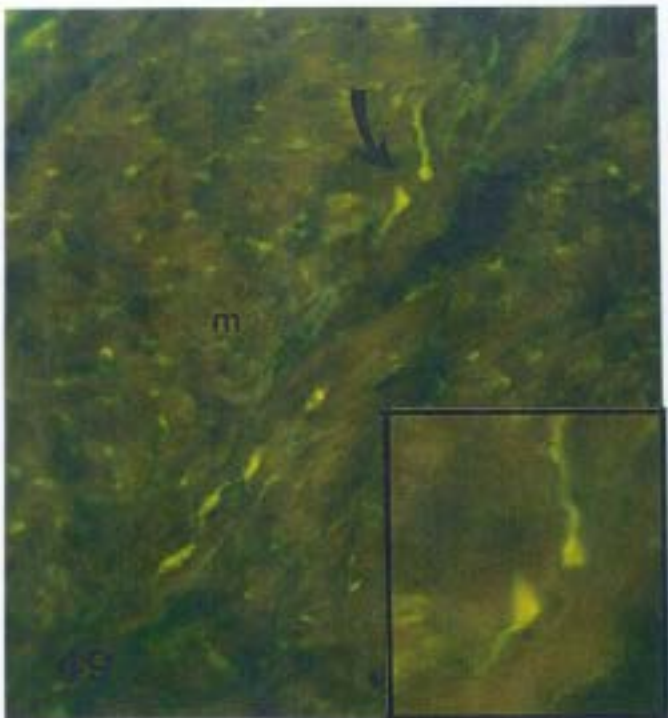
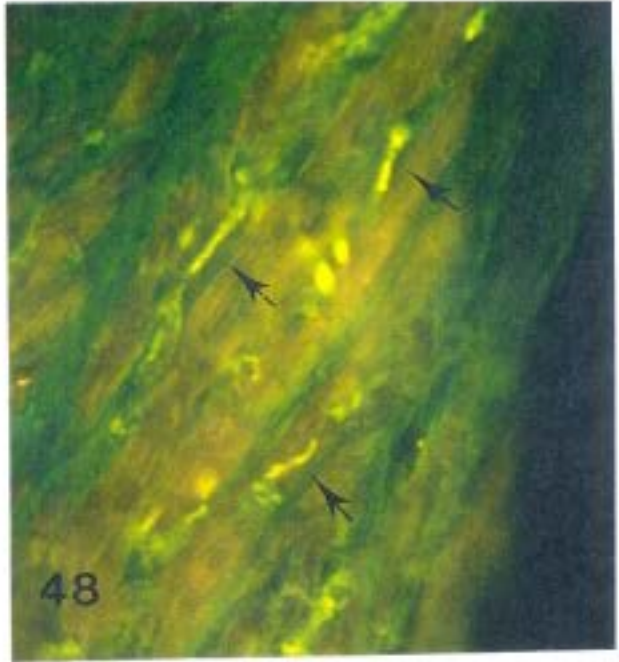
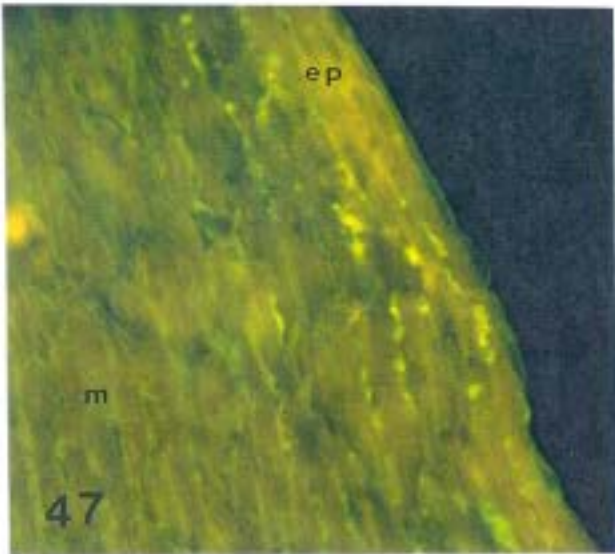
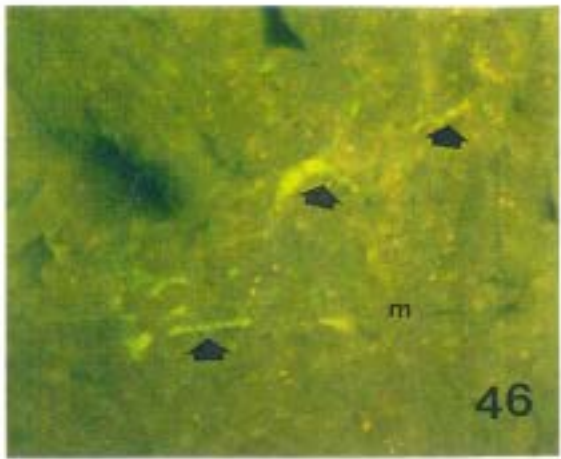
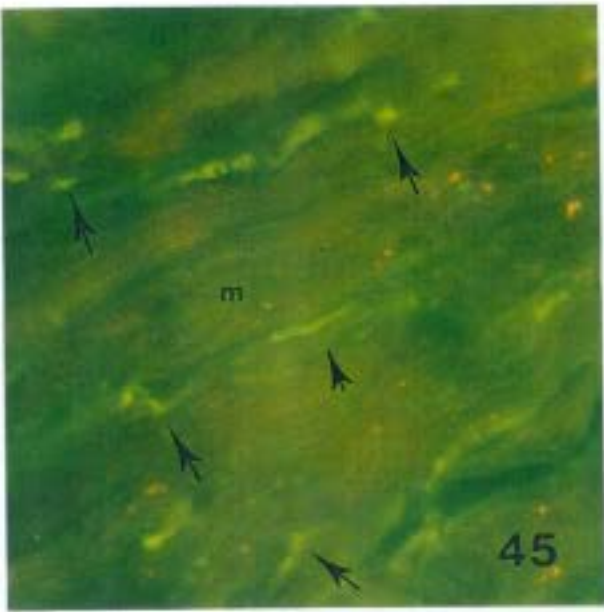
Fig. 46. NPY. Fibras largas NPY-IR en el espesor de la pared miocárdica del VI (flechas) (20 x).

Fig. 47. NPY. Región subepicárdica de VI. Moderada inervación NPY-IR; ep: epicardio; m: miocardio (40 x).

Fig. 48. NPY. Ventrículo Derecho. Inserción de la valva septal de la Tricúspide con fibras nerviosas NPY-IR (flechas) (40 x).

Fig. 49. NPY. Inervación NPY-IR en miocardio de VD (20x). En el recuadro inferior, detalle a mayor aumento de fibras nerviosas NPY-IR con dilataciones varicosas (40 x).

Fig. 50. VIP. Ventrículo Izquierdo. Inserción de la valva septal de la Mitral VIP-IR (flecha) (20 x).



PAREDES DEL CORAZON

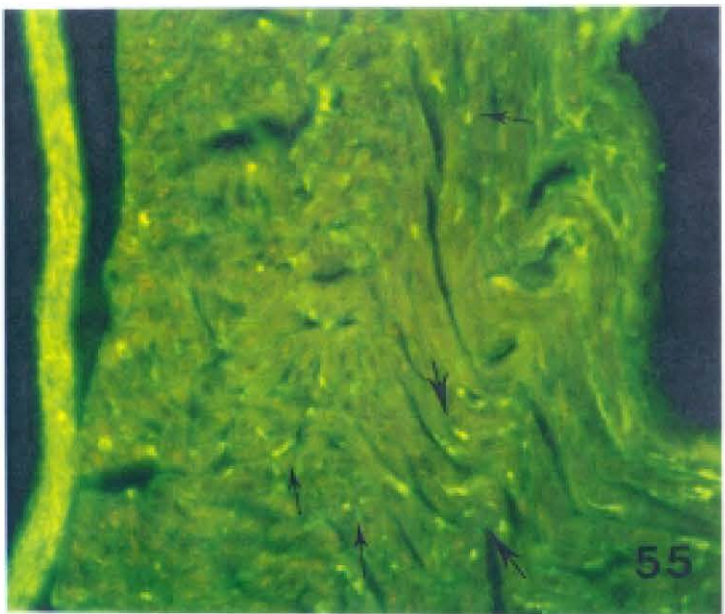
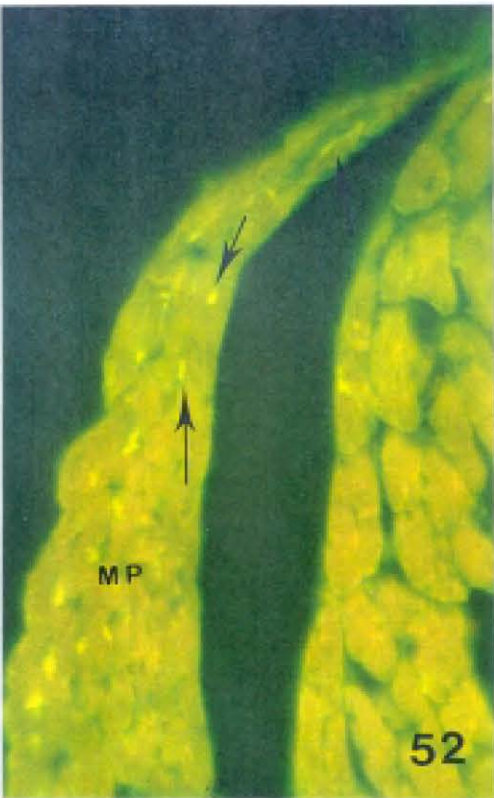
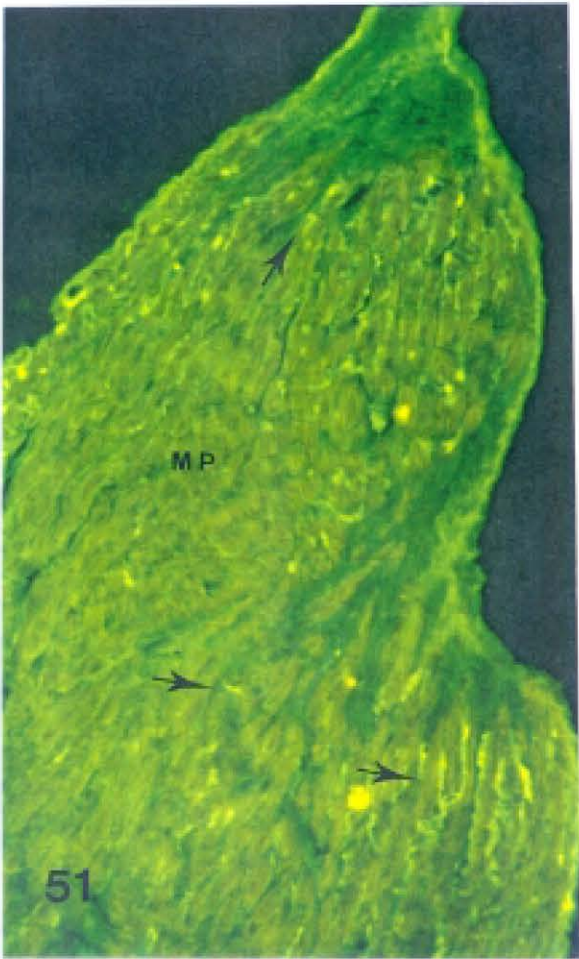
Fig. 51. NPY. Numerosas fibras nerviosas NPY-IR (flechas) inervan el músculo papilar septal (MP) (20 x).

Fig. 52. SP. Moderada densidad de inervación SP-IR a nivel del músculo papilar septal (flechas) (20 x).

Fig. 53. SP. Aurícula Derecha. Numerosas fibras SP-IR (20 x).

Fig. 54. SP. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 55. SP. Inervación positiva para SP en Aurícula Izquierda (flechas) (20 x).



PAREDES DEL CORAZON

Fig. 56. NPY. Región subepicárdica de AD con alta densidad de inervación NPY-IR (flechas); ep: epicardio (20 x).

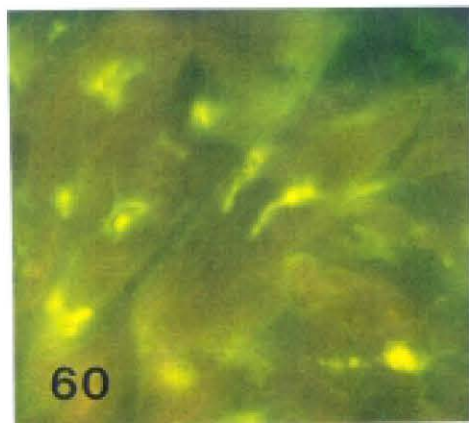
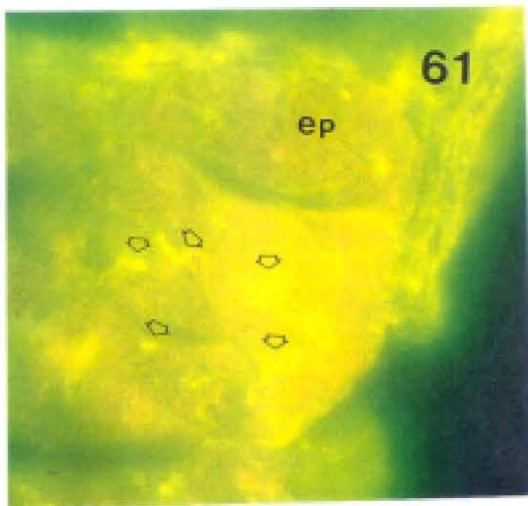
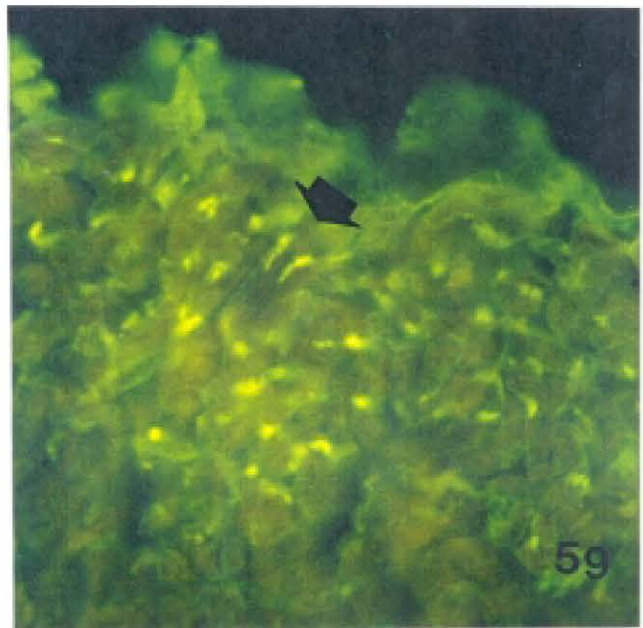
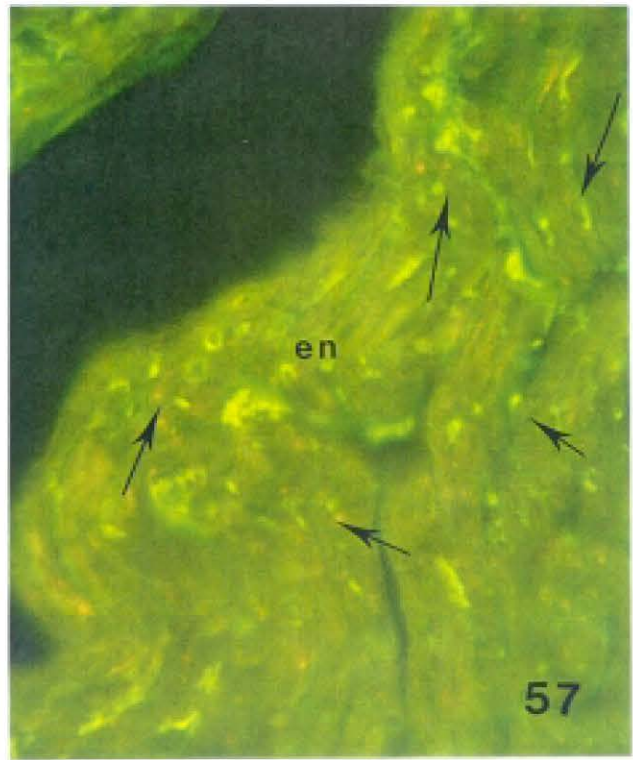
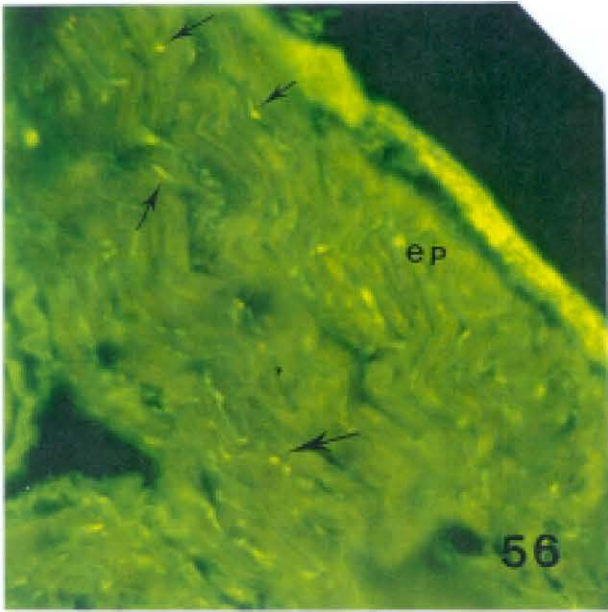
Fig. 57. NPY. Región subendocárdica de AD muy positiva para NPY (flechas); en: endocardio(40 x).

Fig. 58. NPY. Pared posterior de AD positiva (flechas); A: aurícula; V: ventrículo (10 x).

Fig. 59. NPY. Acúmulo de fibras nerviosas NPY-IR con dilataciones varicosas localizado a nivel de la porción superior del septum interauricular (flecha) (20x).

Fig. 60. NPY. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 61. VIP. Acúmulo de fibras nerviosas VIP-IR a nivel de región subepicárdica de AI (40 x).



PAREDES DEL CORAZON

Fig. 62. SP. Zona de inserción septal de la válvula aórtica (VA) SP - negativa (20 x).

Fig. 63. NPY. Fibras nerviosas NPY-IR asociadas con las fibras musculares del anillo valvular de la válvula Mitral (flecha) (40 x).

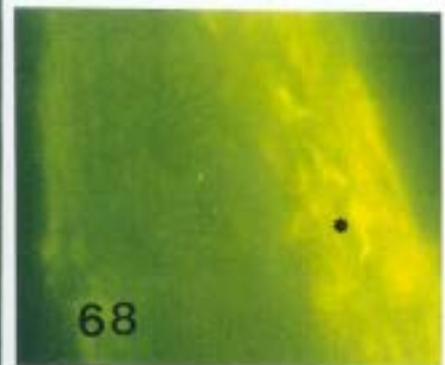
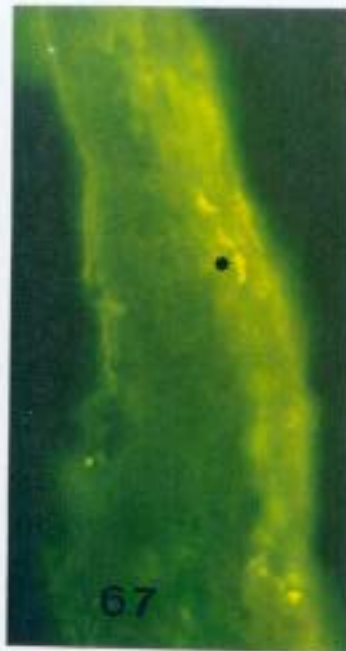
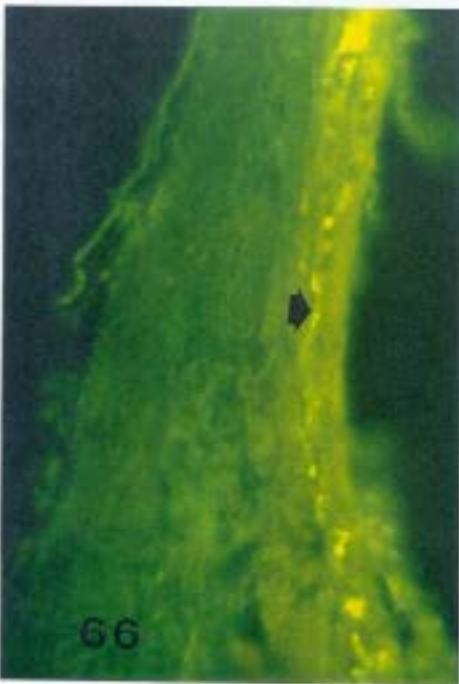
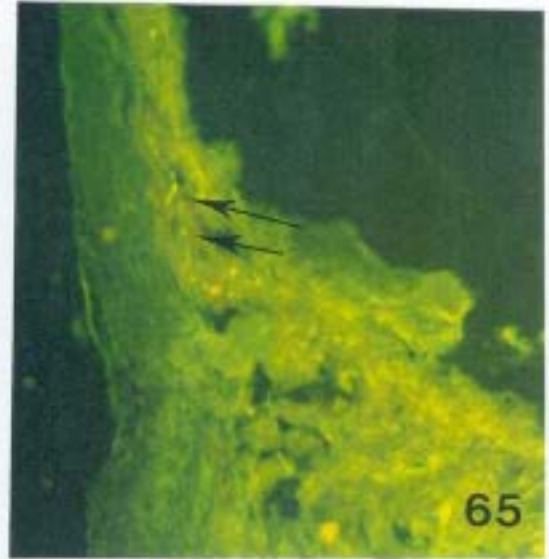
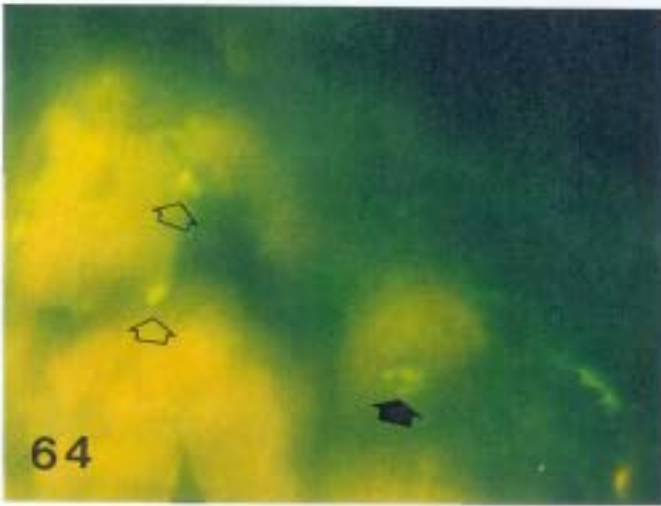
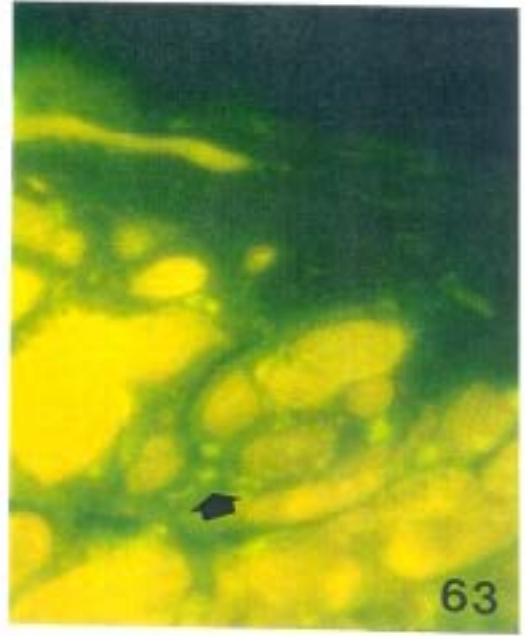
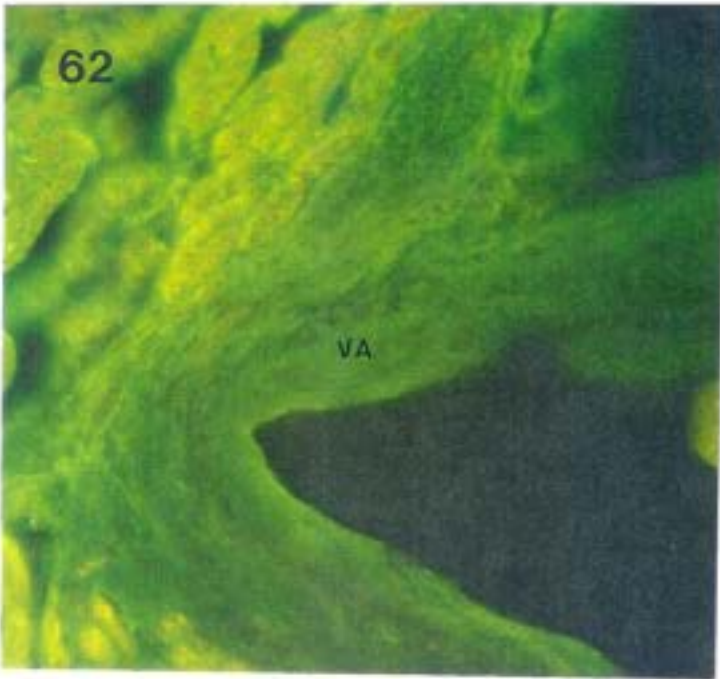
Fig. 64. SP. Fibras nerviosas SP-IR (flechas) asociadas con la válvula Tricúspide (40 x).

Fig. 65. SP. Corte transversal a nivel de la valva septal de la válvula Mitral, con fibras nerviosas SP-IR a nivel de su inserción (flechas) (10 x).

Fig. 66. SP. Detalle a mayor aumento de la imagen anterior (20 x).

Fig. 67. SP. Fibra nerviosa SP-IR a nivel más distal de la valva septal Mitral (asterisco) (20 x).

Fig. 68. Detalle de la imagen anterior (40 x).



3) ARTERIAS CORONARIAS.

Las ARTERIAS CORONARIAS presentan una densa inervación por fibras nerviosas SP-IR. Gruesos troncos nerviosos paravasculares y entre las fibras musculares subepicárdicas se identifican en todas las preparaciones estudiadas a nivel de ambas arterias coronarias (Fig. 69). De estos troncos nerviosos SP-IR parten delicadas fibras que llegan a inervar la adventicia de los vasos (Figs. 70 y 71). No se observa inervación SP-IR en los vasos de pequeño tamaño (Fig. 72).

También las arterias coronarias presentan una densa inervación por fibras nerviosas NPY-IR aunque la densidad es algo menor que para SP. Asimismo, se objetivan troncos nerviosos en la región subepicárdica de los que parten fibras NPY-IR hacia la adventicia de los vasos (Figs. 73 a 75). Tampoco los vasos pequeños presentan inervación NPY-IR.

En las arterias coronarias, la inervación por fibras VIP-IR es escasa. Unas pocas fibras con débil inmunofluorescencia están presentes en la zona que rodea las arterias coronarias epicárdicas (Fig. 76). En numerosas secciones, no se identifican fibras en contacto con los vasos (Fig. 77). Por el contrario, en los vasos de pequeño tamaño, aunque difícil de demostrar, parecen identificarse fibras nerviosas VIP-IR cercanas a los mismos (Figs. 78 y 79).

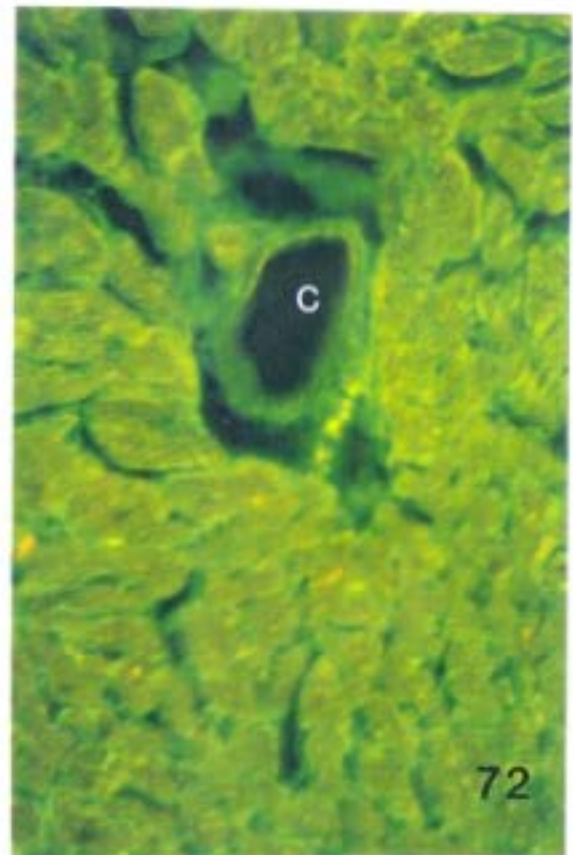
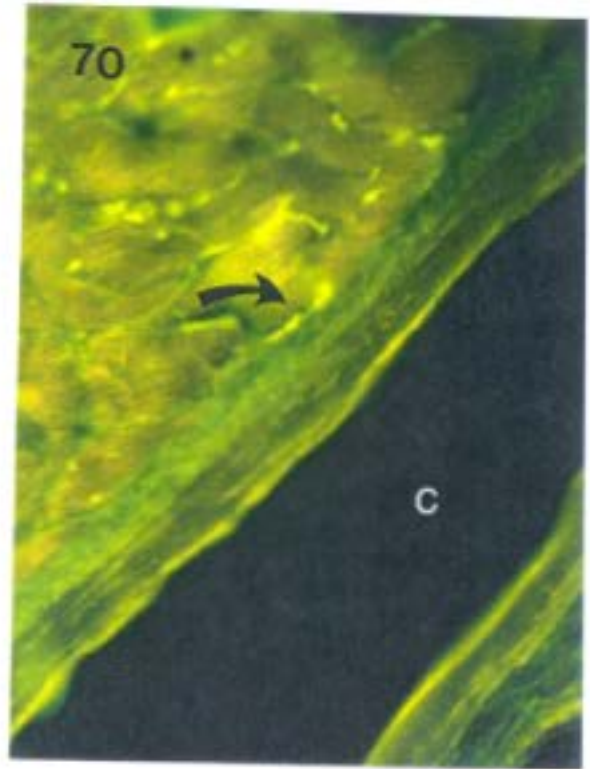
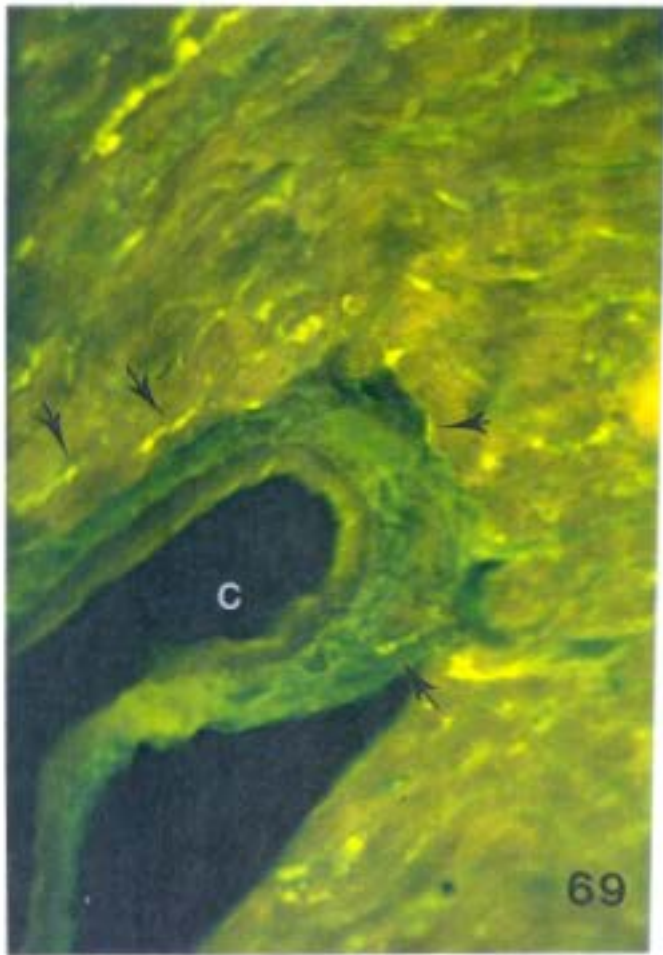
ARTERIAS CORONARIAS

Fig. 69. SP. Inervación por fibras SP-IR (flechas) de la arteria coronaria izquierda y miocardio adyacente; C: arteria coronaria (20x).

Fig. 70. SP. Fibras nerviosas SP-IR en la adventicia de la arteria coronaria izquierda (flecha); C: arteria coronaria (20 x).

Fig. 71. SP. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 72. SP. Arteria de pequeño tamaño (C) en miocardio de VI sin inmunorreactividad (20 x).



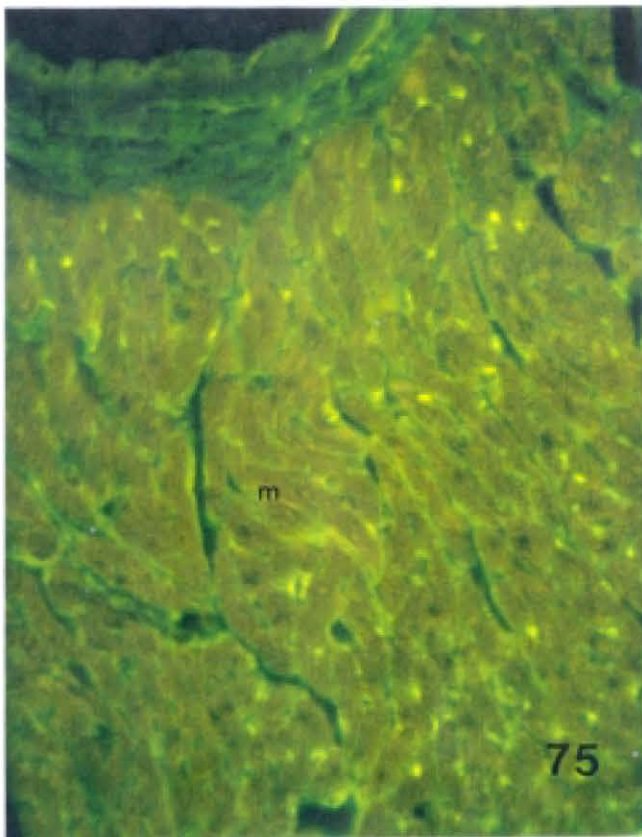
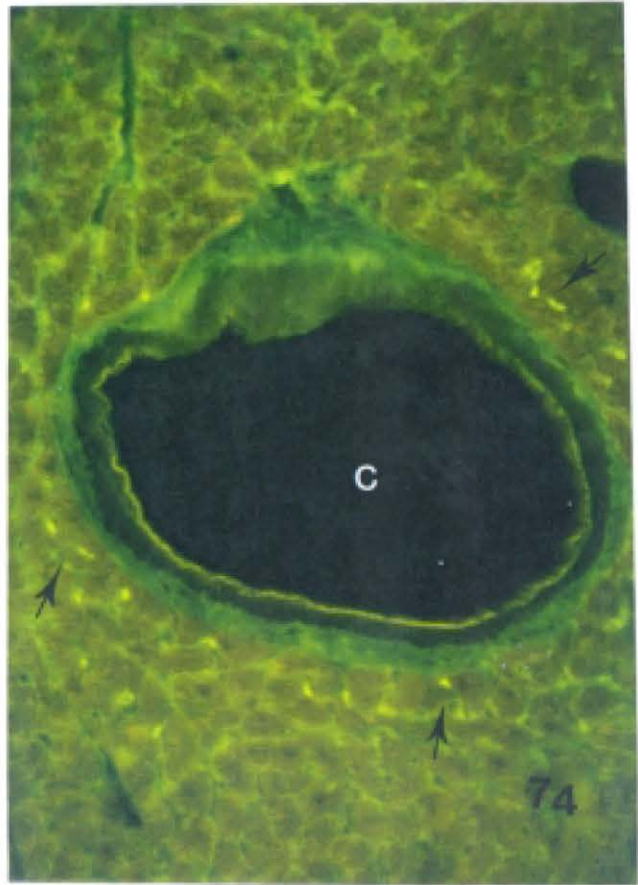
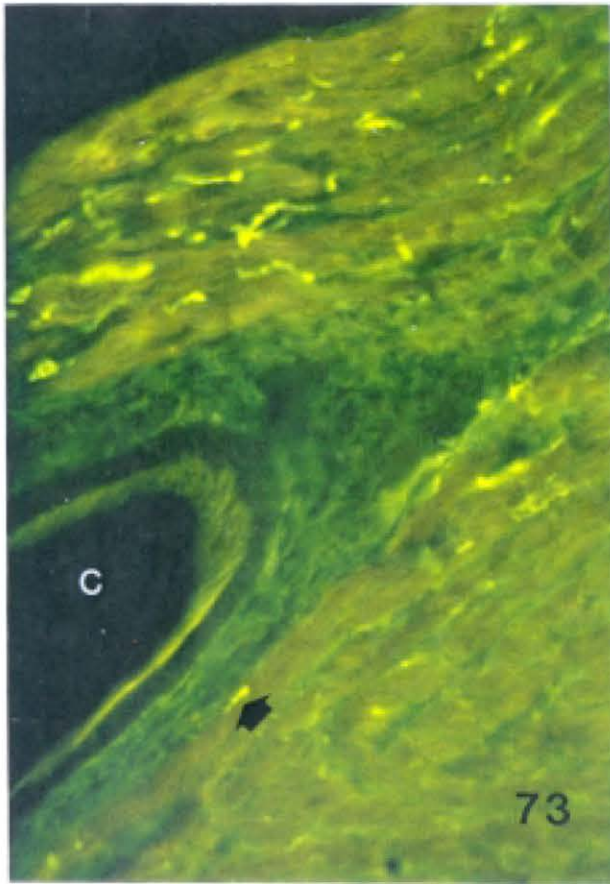
ARTERIAS CORONARIAS

Fig. 73. NPY. Arteria coronaria izquierda (C) con fibras nerviosas NPY-IR (20 x).

Fig. 74. NPY. Fibras nerviosas NPY-IR (flechas) cercanas a la arteria coronaria (C) derecha (20 x).

Fig. 75. NPY. Inervación NPY-positiva en miocardio de VD cercano a arteria coronaria derecha (20 x).

Fig. 76. VIP. Débil inmuorreactividad en torno a arteria coronaria (C) derecha (20 x).

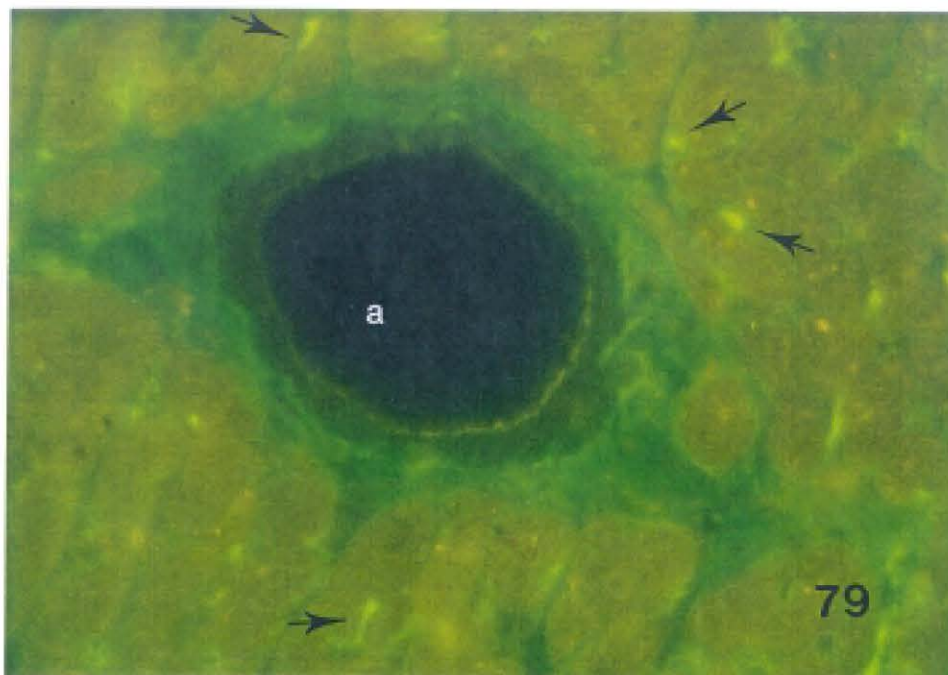
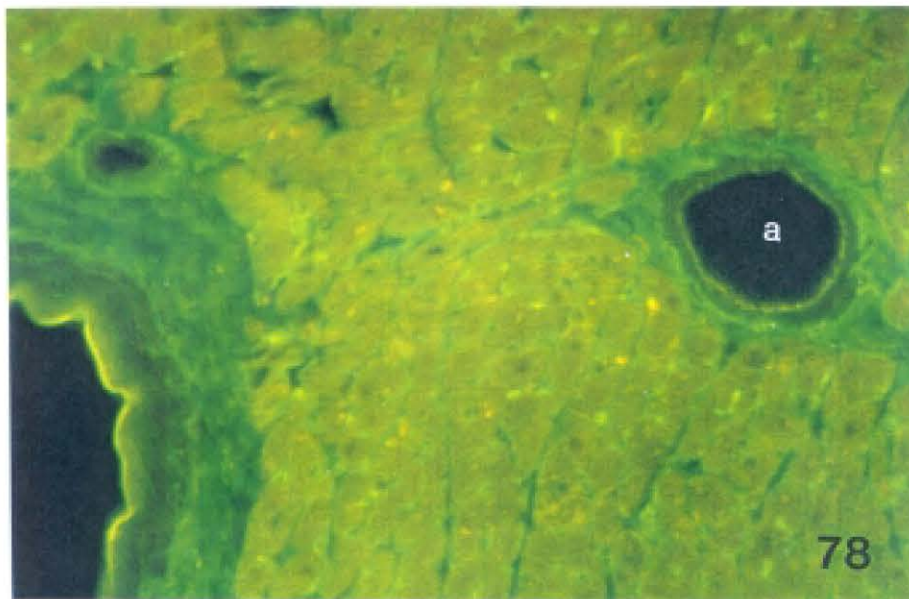
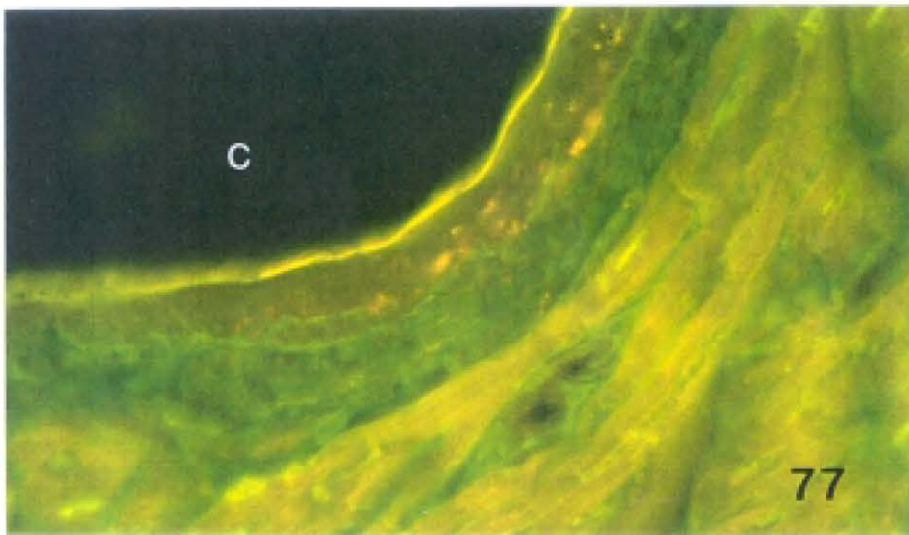


ARTERIAS CORONARIAS

Fig. 77. VIP. Ausencia de inervación por fibras VIP-IR en arteria coronaria (C) izquierda (40 x).

Fig. 78. VIP. Arteria (a) de pequeño tamaño en pared de VD con fibras nerviosas VIP-IR cercanas a la misma (20 x).

Fig. 79. VIP. Detalle de la imagen anterior (40 x).



4) GRANDES VASOS

Con el fin de valorar la inervación peptidérgica de los grandes vasos que se originan del corazón, estudiamos tres zonas: proximal (a nivel de la base del corazón), media y distal (a nivel del arco aórtico para la aorta y en la bifurcación para la arteria pulmonar). También valoramos la existencia de fibras nerviosas a nivel del espacio interaortopulmonar.

La inervación de los grandes vasos por fibras SP-IR es, en general, bastante abundante. Identificamos fibras nerviosas SP-IR a todos los niveles de la aorta aunque su densidad decrece de proximal a distal. En la base del corazón, a nivel del origen en el VI, observamos gruesos y largos troncos nerviosos en disposición paravascular, que discurren en la parte más externa de la adventicia (Fig. 80). De ellos, parten fibras finas que alcanzan la media. Como hemos dicho, también se identifican fibras nerviosas SP-IR tanto en la zona media (Figs. 81 y 82) como distal (Fig. 83) pero no como troncos nerviosos largos sino como finas fibras y alargadas en la porción media de la adventicia.

En la arteria pulmonar también se identifican fibras nerviosas SP-IR a todos los niveles (Figs. 84 a 86) pero con una densidad de inervación menor que la de la aorta.

Un hecho observado en muchas de las preparaciones estudiadas a gran aumento, es la aparición a nivel de la íntima de la pared de los vasos de una inmunorreactividad característica de SP, que sugiere la existencia de terminaciones nerviosas SP-IR

subendotelialmente a nivel de aorta proximal y tronco arterial pulmonar (Figs. 87 y 88). Esto no se observa en ninguna de las preparaciones estudiadas con NPY ni con VIP.

La inervación de la aorta por fibras NPY-IR es menor que la encontrada para SP. Aunque se identifican fibras nerviosas NPY-IR a todos los niveles estudiados: proximal (Fig. 89), media (Fig. 90) y distal (Fig. 91) y la densidad también decrece de proximal a distal, no se identifican largos troncos nerviosos como los observados con SP. Por el contrario, las fibras son finas y con inmunorreactividad más débil.

La arteria pulmonar presenta una densidad de inervación NPY-IR más baja que la de la aorta encontrando sólo fibras aisladas a nivel proximal y medio (Figs. 92 a 94).

La densidad de fibras nerviosas VIP-IR en los grandes vasos que se originan del corazón es mucho menor que la observada para SP y NPY. Las fibras aisladas que se identifican tanto en aorta (Figs. 95 y 96) como en la arteria pulmonar (Figs. 97 y 98) son extremadamente finas, dispuestas en localización perivascular en la unión media-adventicia y con una débil inmunorreactividad que, unido a la intensa autofluorescencia de la gruesa media de la aorta, hace en muchas ocasiones difícil su identificación. En la media o en la íntima no se pueden identificar fibras nerviosas VIP-IR.

En la vena cava no se identifican estructuras nerviosas con ninguno de los tres neuropéptidos empleados.

Respecto al espacio interaortopulmonar, se observan estructuras nerviosas con intensa inmunofluorescencia tanto en los marcajes con NPY (Fig. 99) como con VIP (Figs. 100 y 101). Las fibras son largas y gruesas, sugerentes en algunas ocasiones de cuerpos celulares. No se observa marcaje SP-IR en el espacio interaortopulmonar (Fig. 102).

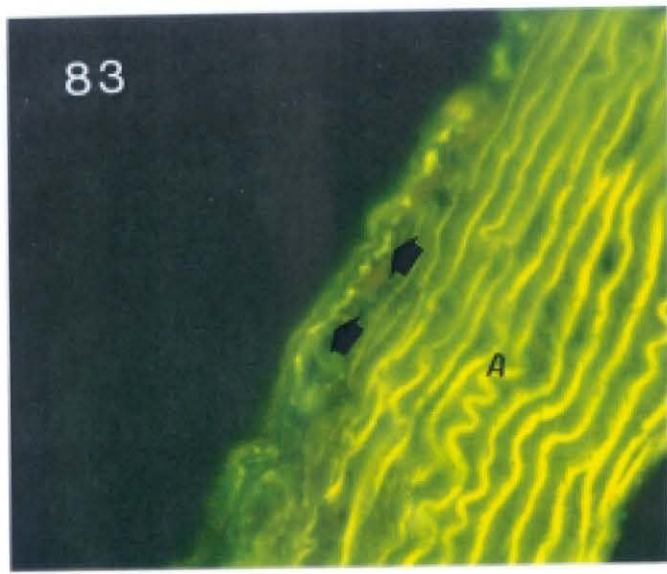
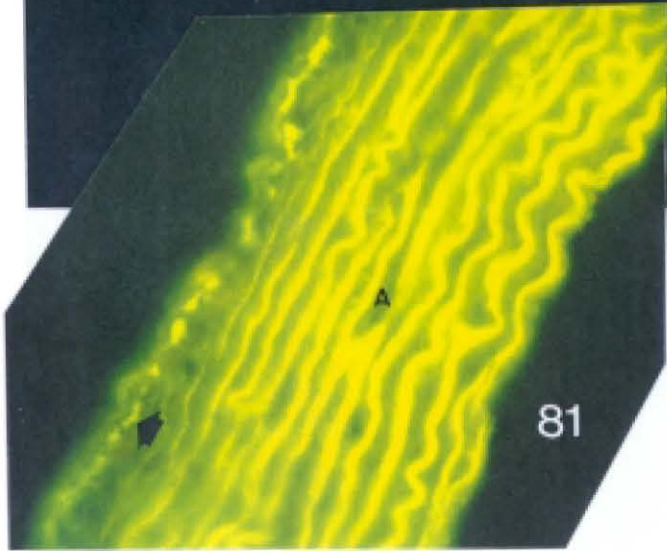
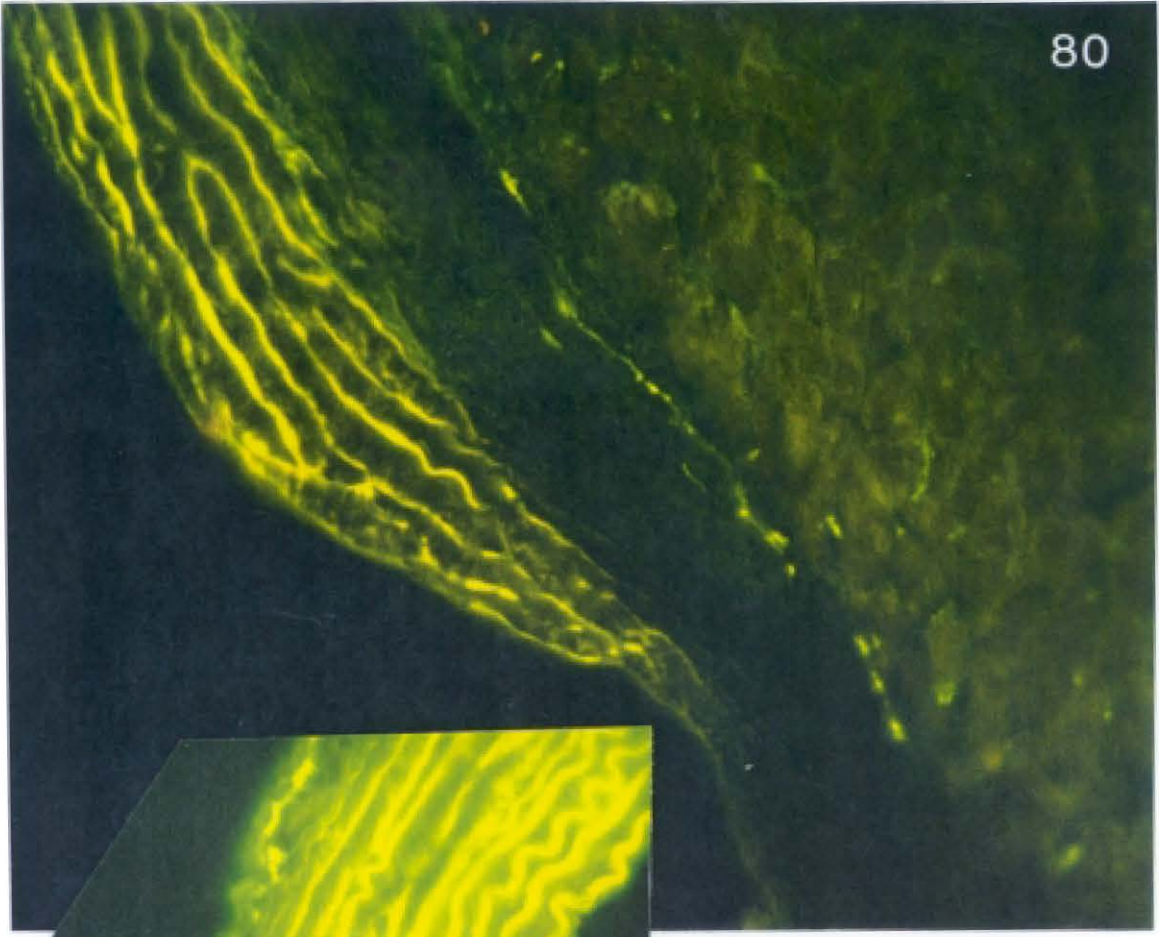
GRANDES VASOS

Fig. 80. SP. Corte longitudinal a nivel de la aorta ascendente a nivel de la base del corazón. Se observan fibras nerviosas largas SP-IR a nivel de la adventicia (20 x).

Fig. 81. SP. Aorta (A) ascendente a nivel medio (20 x).

Fig. 82. SP. Fibra nerviosa SP-IR (flecha) a nivel medio de la arteria aorta (A) (20 x).

Fig. 83. SP. Corte longitudinal a nivel de aorta (A) ascendente a nivel distal positiva para SP (flechas) (20 x).



GRANDES VASOS

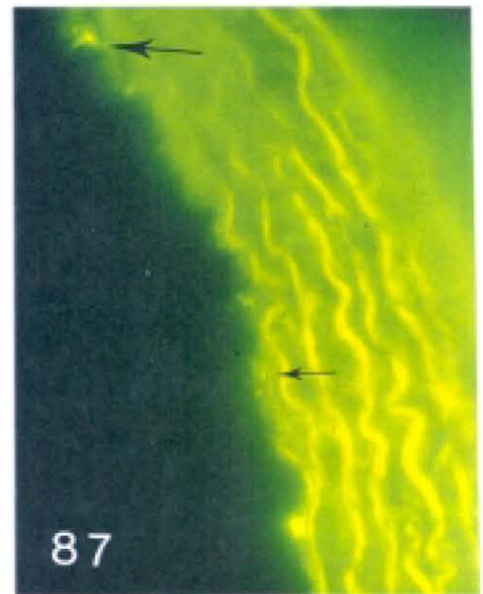
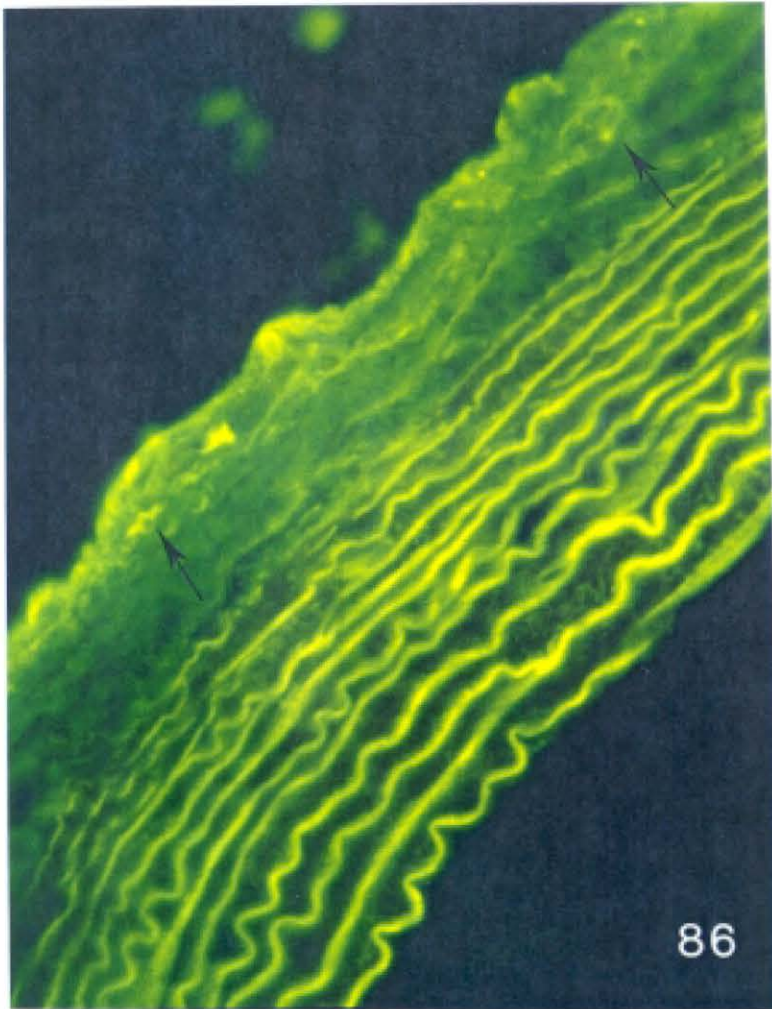
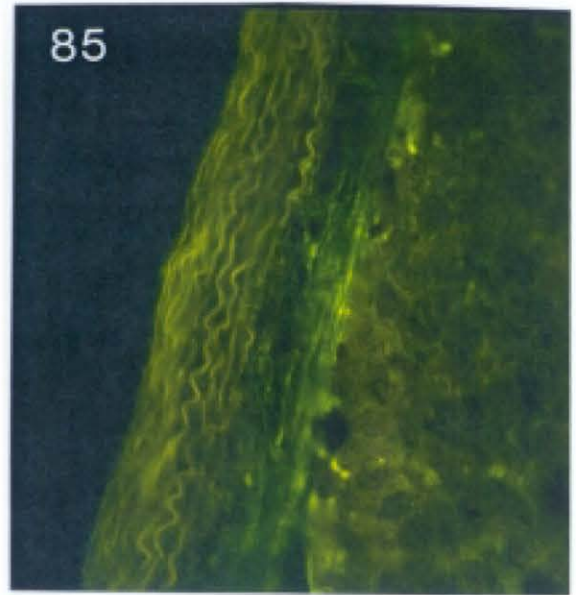
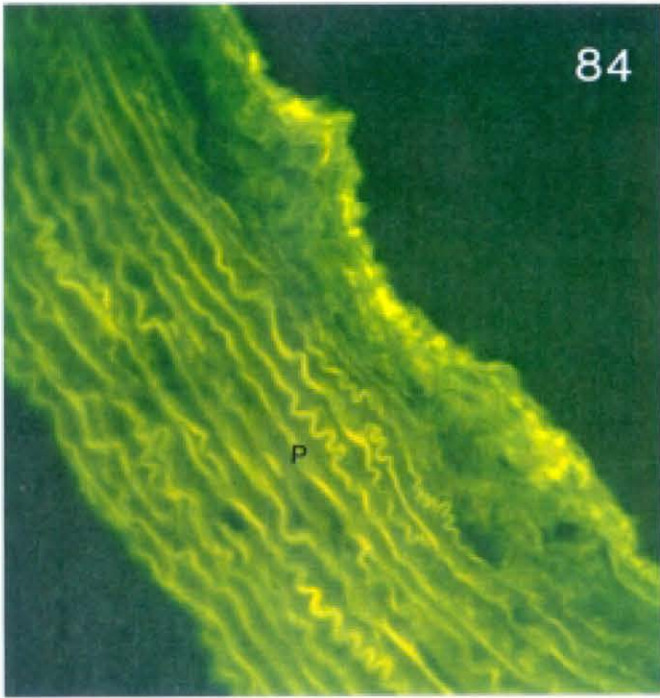
Fig. 84. SP. Arteria pulmonar (P) proximal. Baja densidad de inervación SP-IR (20 x).

Fig. 85. SP. Arteria pulmonar a nivel medio (10 x).

Fig. 86. SP. Fibras nerviosas SP-IR aisladas (flechas) en arteria pulmonar a nivel distal (20 x).

Fig. 87. SP. Depósito subendotelial de material SP-IR a nivel de aorta proximal (flechas) (40 x).

Fig. 88. SP. Depósito subendotelial de material SP-IR a nivel de arteria pulmonar (flecha) (40 x).



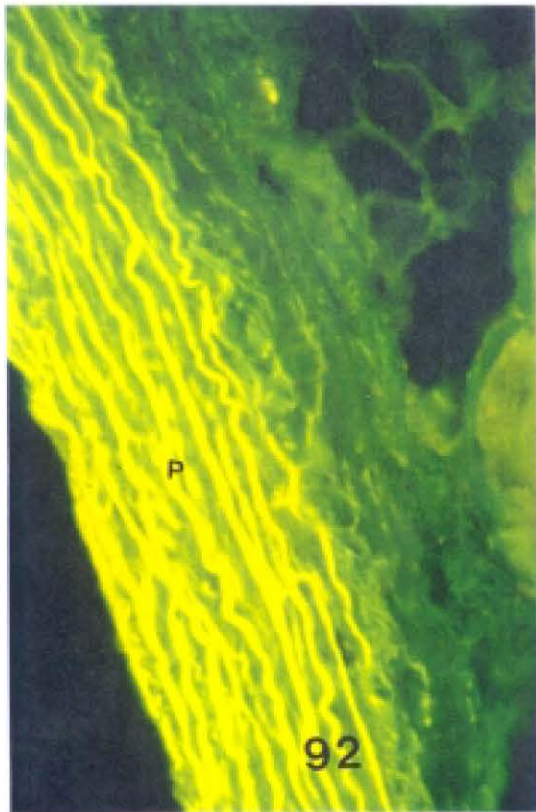
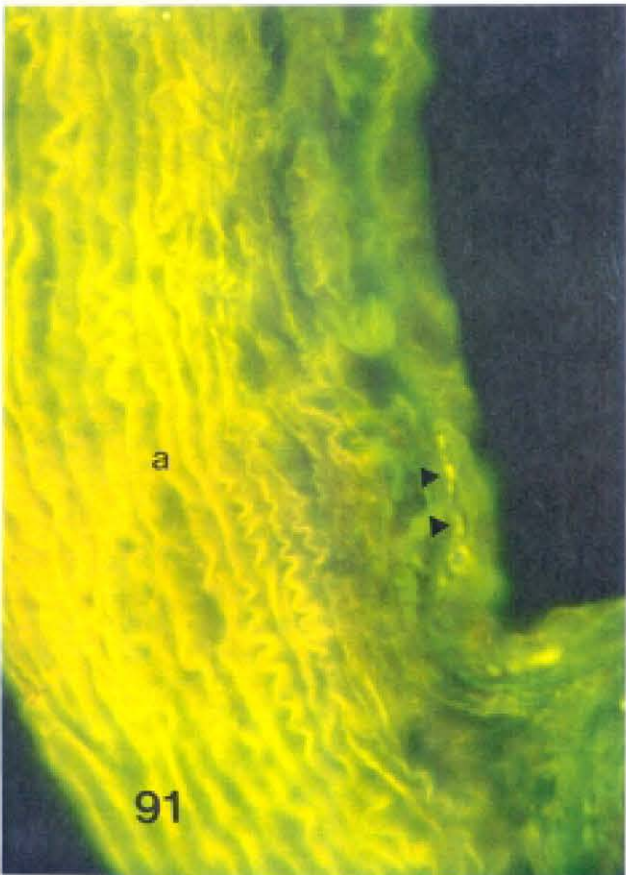
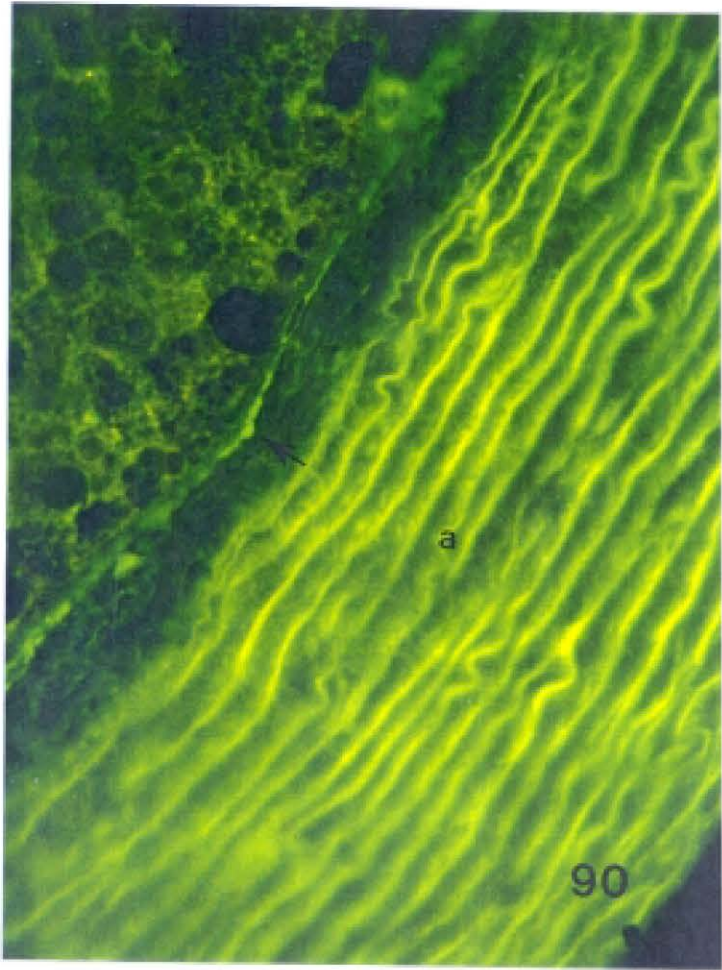
GRANDES VASOS

Fig. 89. NPY. Fibra nerviosa NPY-IR (flecha) a nivel de la adventicia de aorta (a) ascendente proximal (40 x).

Fig. 90. NPY. Aorta (a) ascendente a nivel medio positiva para NPY (flecha) (20 x).

Fig. 91. NPY. Aorta (a) ascendente a nivel distal. Corte longitudinal con fibras nerviosas NPY-IR aisladas (flechas) (20 x).

Fig. 92. NPY. Arteria pulmonar (p) proximal débilmente positiva para NPY (20 x).



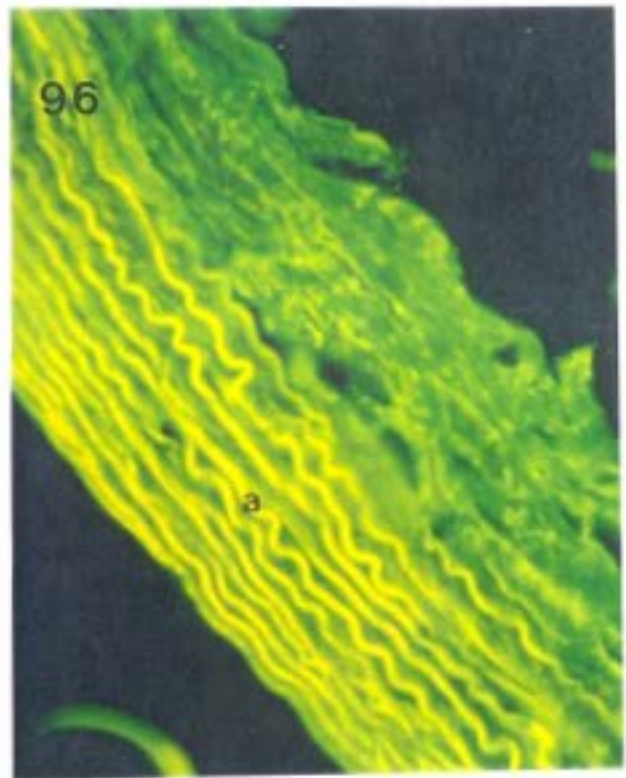
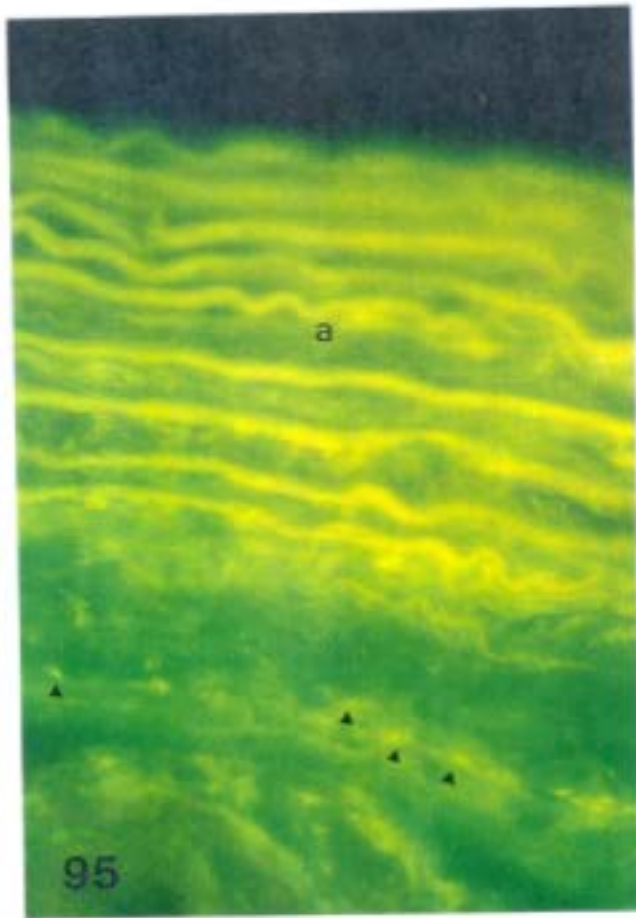
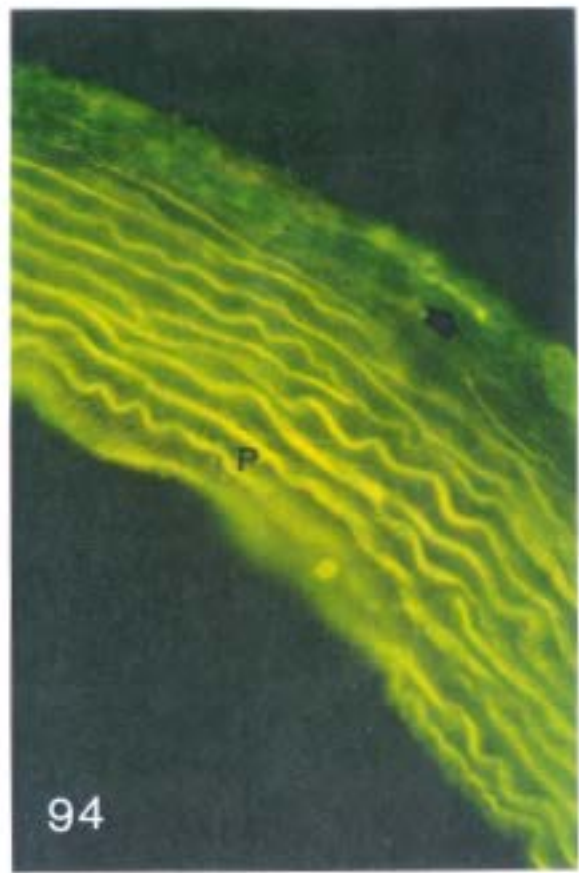
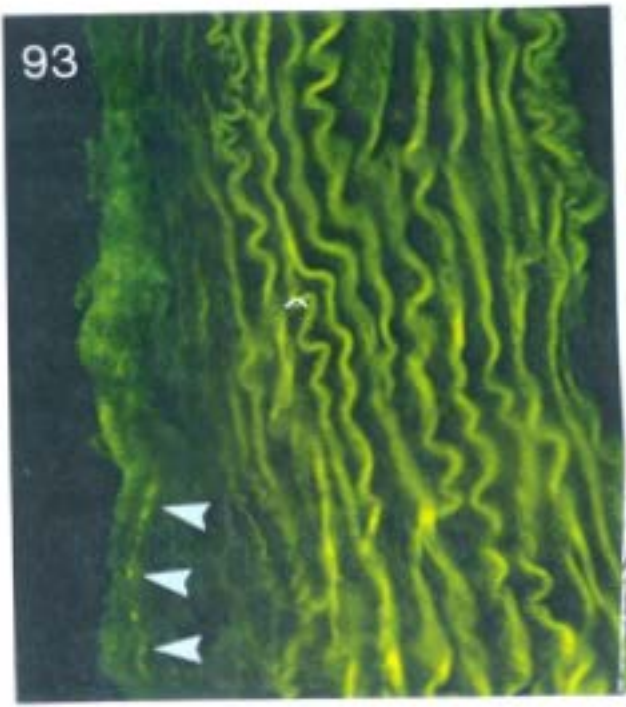
GRANDES VASOS

Fig. 93. NPY. Fibras nerviosas NPY-IR (flechas) en adventicia de arteria pulmonar a nivel medio (20 x).

Fig. 94. NPY. Arteria pulmonar (p) a nivel medio (20 x).

Fig. 95. VIP. Corte transversal a nivel de aorta (a) ascendente proximal con débil inmunorreactividad para VIP (flechas) (40 x).

Fig. 96. VIP. Corte longitudinal a nivel de aorta (a) ascendente negativo (20 x).



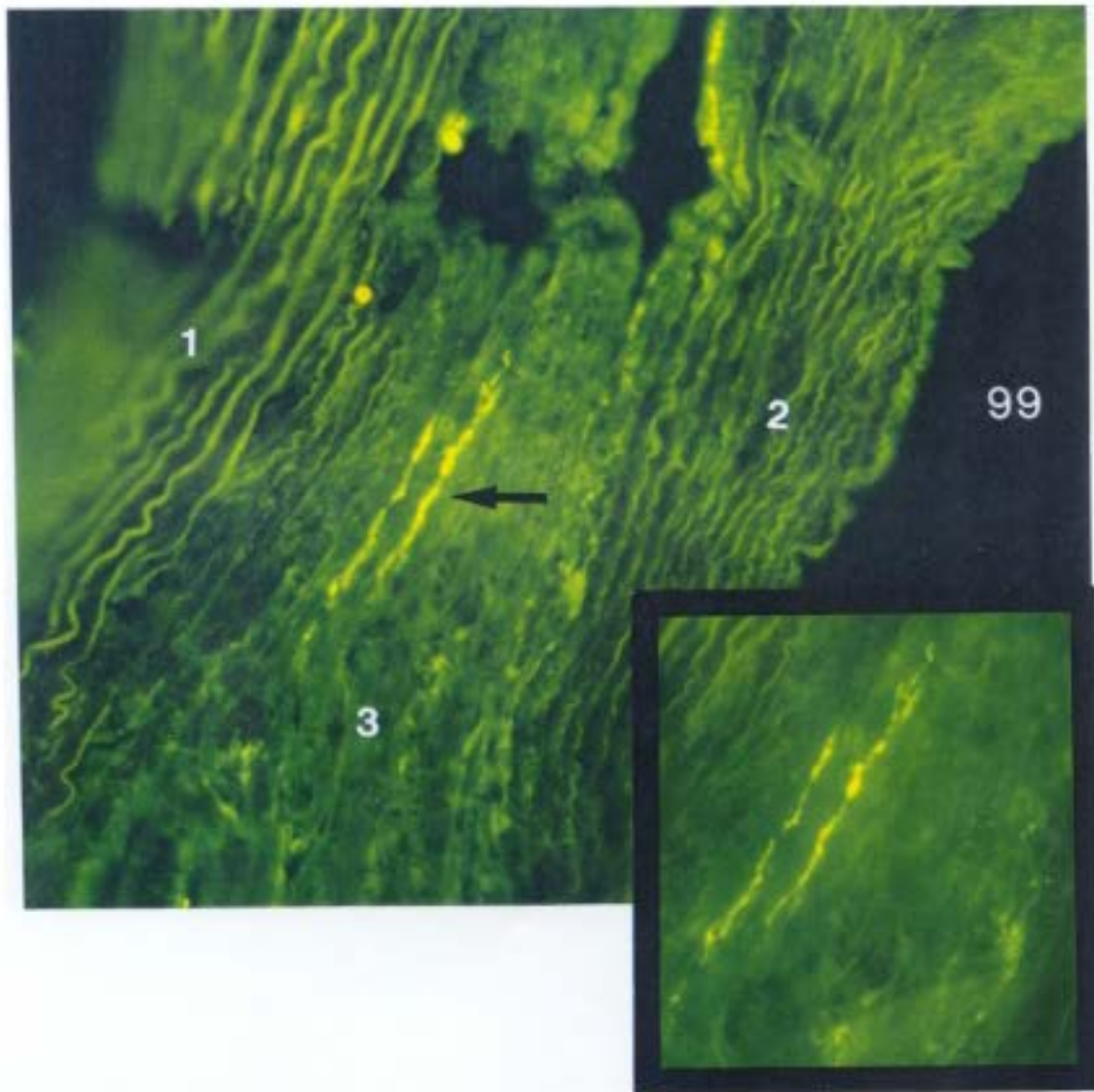
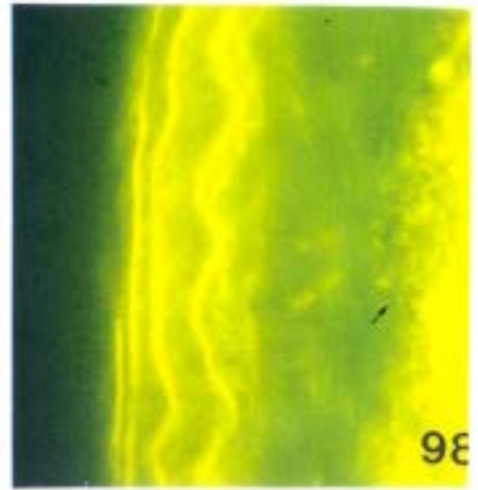
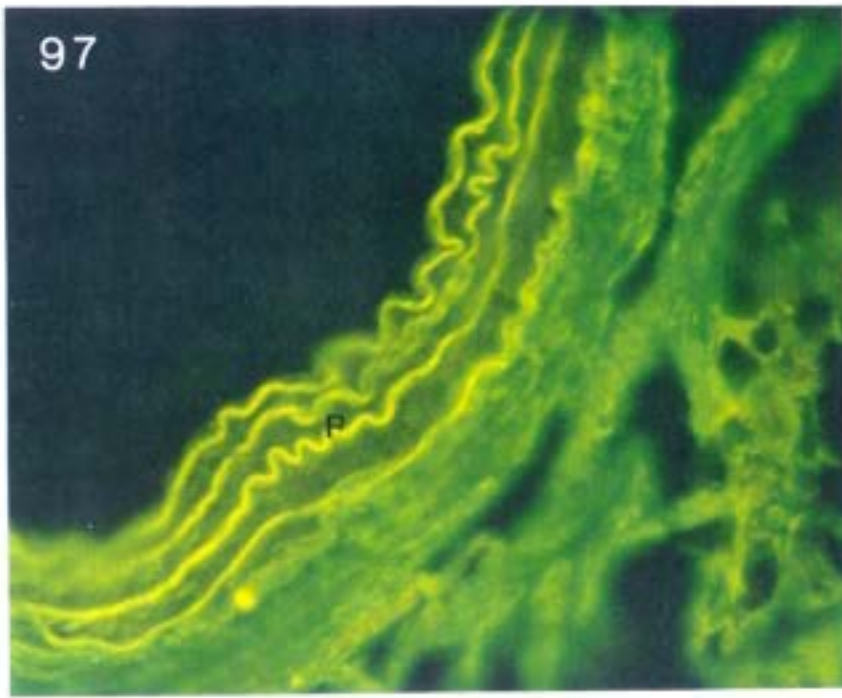
GRANDES VASOS

Fig. 97. VIP. Arteria pulmonar (p) negativa (20 x).

Fig. 98. VIP. Fibra nerviosa VIP-IR en adventicia de arteria pulmonar (flecha) (40 x).

Fig. 99. NPY. Espacio interaortopulmonar. Fibras NPY-IR intensamente fluorescentes (20 x). En el recuadro, ampliación de las fibras nerviosas NPY-IR señaladas por la flecha (40 x).

- 1: Aorta
- 2: Arteria pulmonar
- 3: Espacio interaortopulmonar



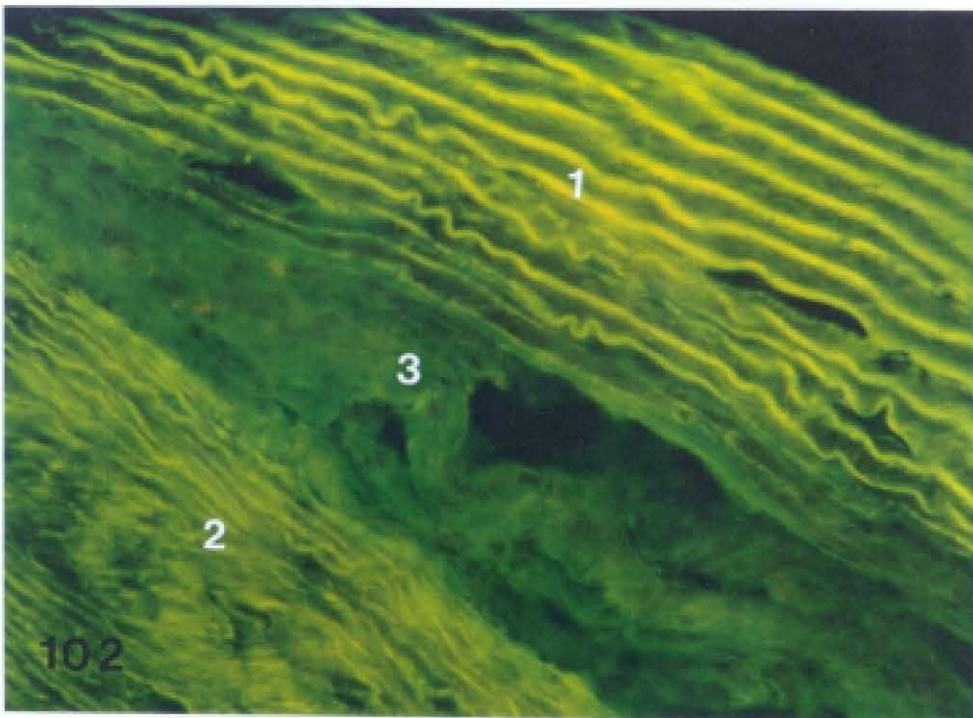
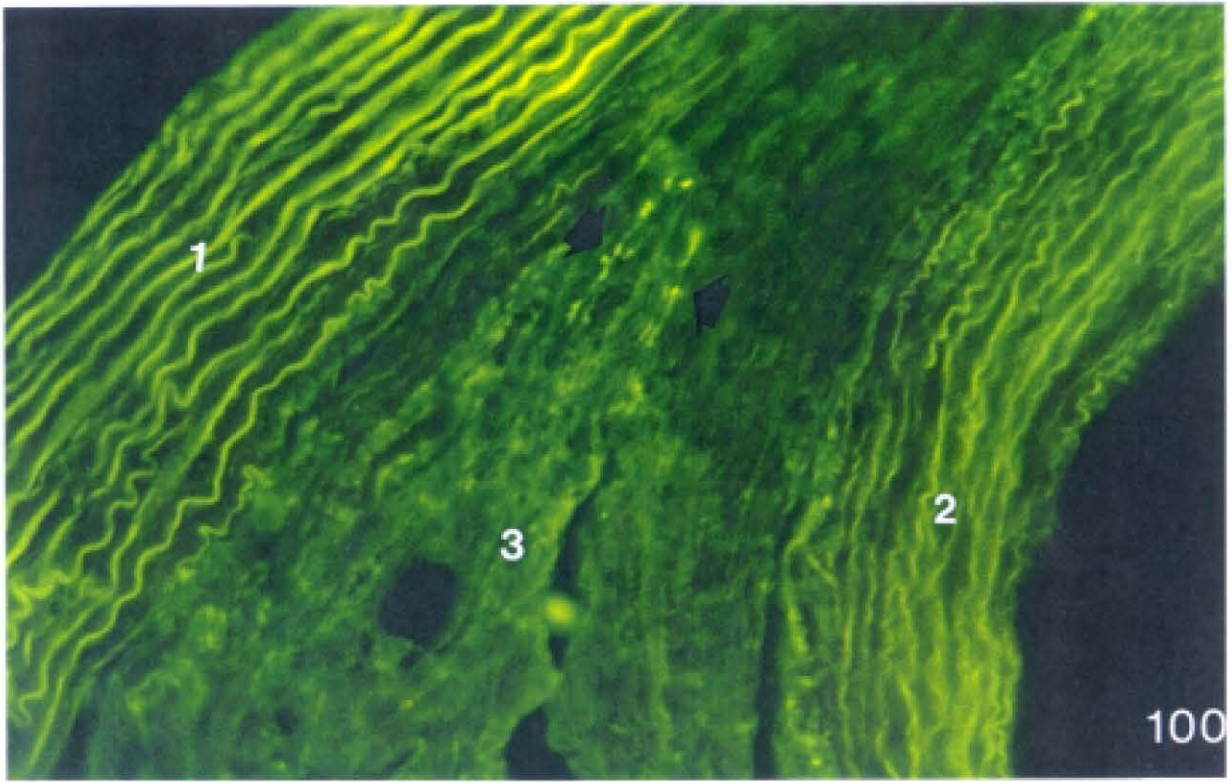
GRANDES VASOS

Fig. 100. VIP. Espacio interaortopulmonar mostrando fibras nerviosas VIP-IR (flechas) (20 x).

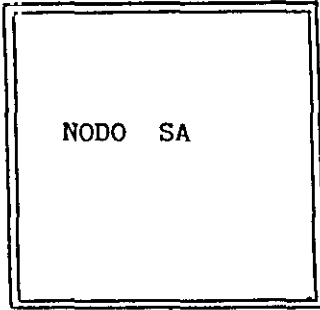
Fig. 101. VIP. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 102. SP. Espacio interaortopulmonar negativo para SP.

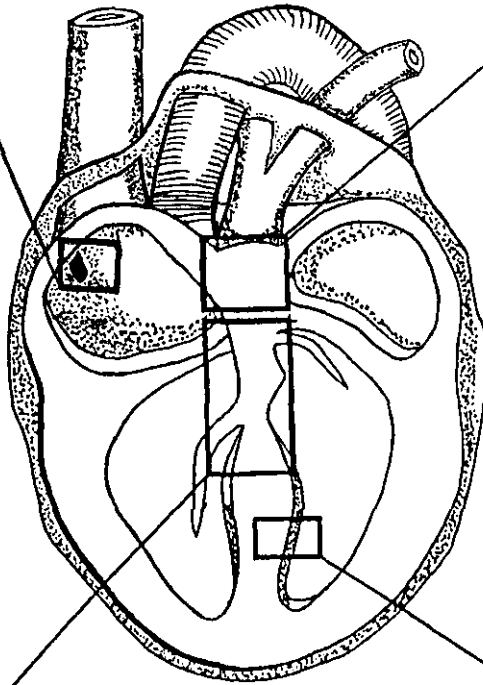
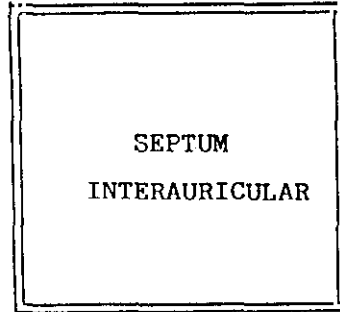
- 1: Aorta
- 2: Arteria pulmonar
- 3: Espacio interaortopulmonar



ESQUEMA A



ESQUEMA B



SP —

NPY —

VIP —

NODO AV
HAZ AV
RAMAS DEL HAZ

REGION DISTAL
DEL SISTEMA
DE CONDUCCION

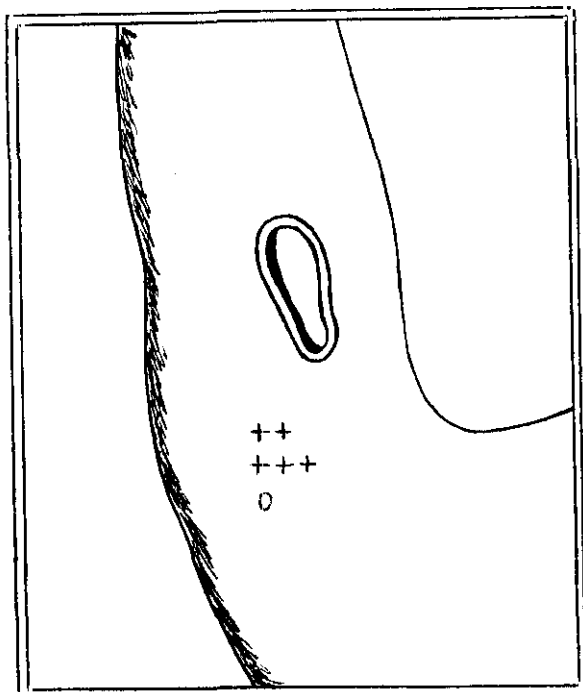
ESQUEMA C

ESQUEMA D

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA DISTRIBUCION DIFERENCIAL DE SP, NPY y VIP
EN EL SISTEMA DE CONDUCCION DEL CORAZON DE LA RATA.

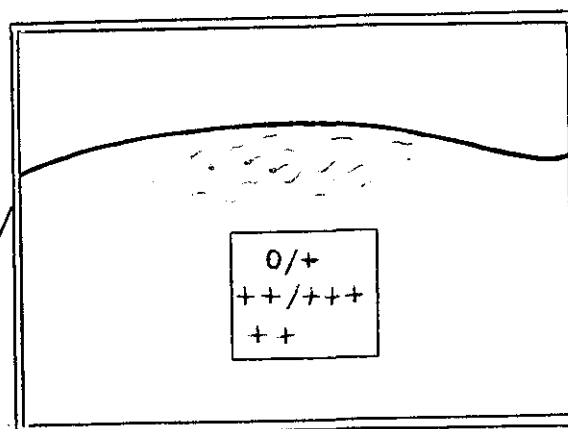
- 0 = No existencia de inervación
- + = Pocas fibras nerviosas
- ++ = Inervación moderada
- +++ = Inervación abundante

ESQUEMA A: NODO SA

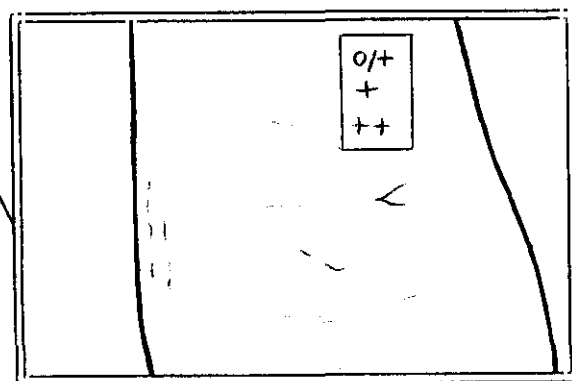


SP ———
 NPY ———
 VIP ———

ESQUEMA B:
 SEPTUM INTERAURICULAR



PROXIMAL

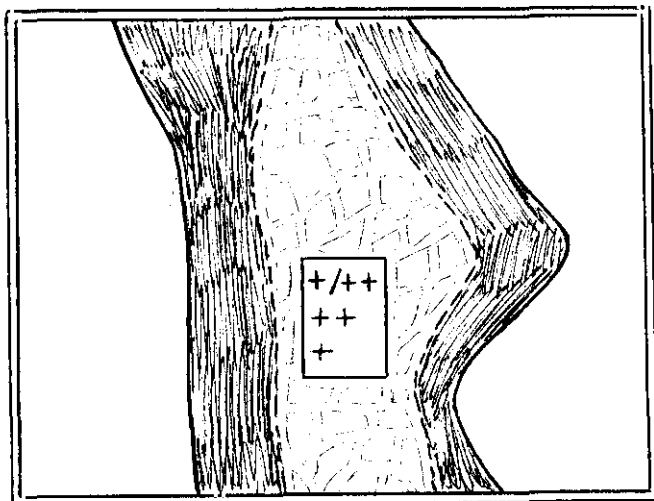


DISTAL

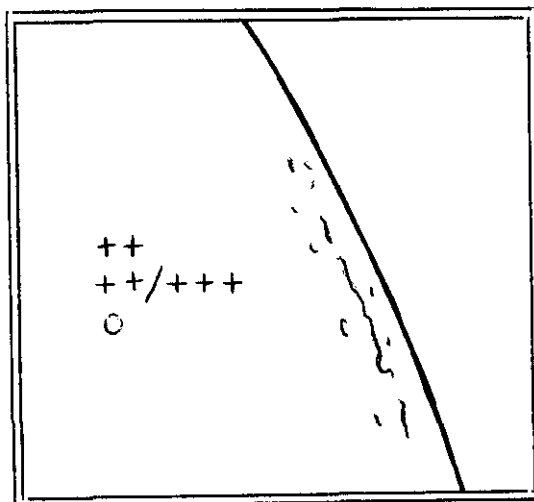
DISTRIBUCION DIFERENCIAL DE SP, NPY Y VIP EN EL NODO SA Y SEPTUM INTERAURICULAR

- 0 = No existencia de inervación
- + = Pocas fibras nerviosas
- ++ = Inervación moderada
- +++ = Inervación abundante

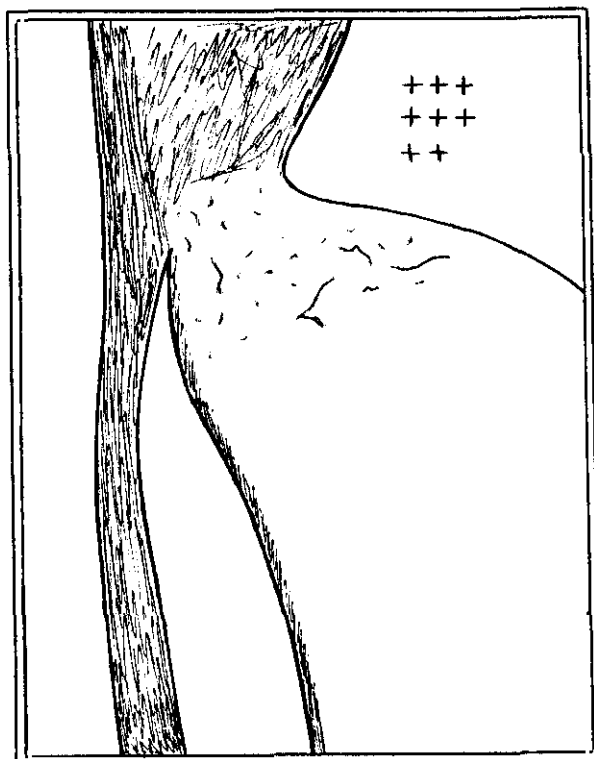
ESQUEMA C: NODO AV



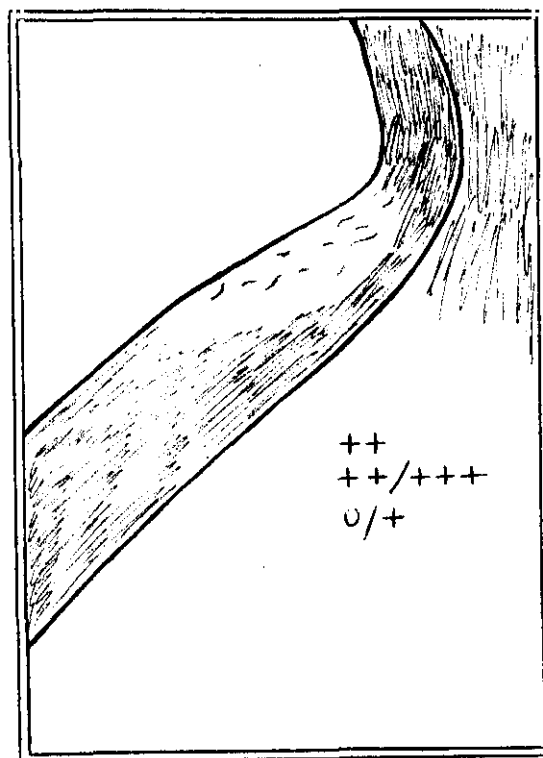
ESQUEMA D: REGION DISTAL



ESQUEMA C: HAZ AV



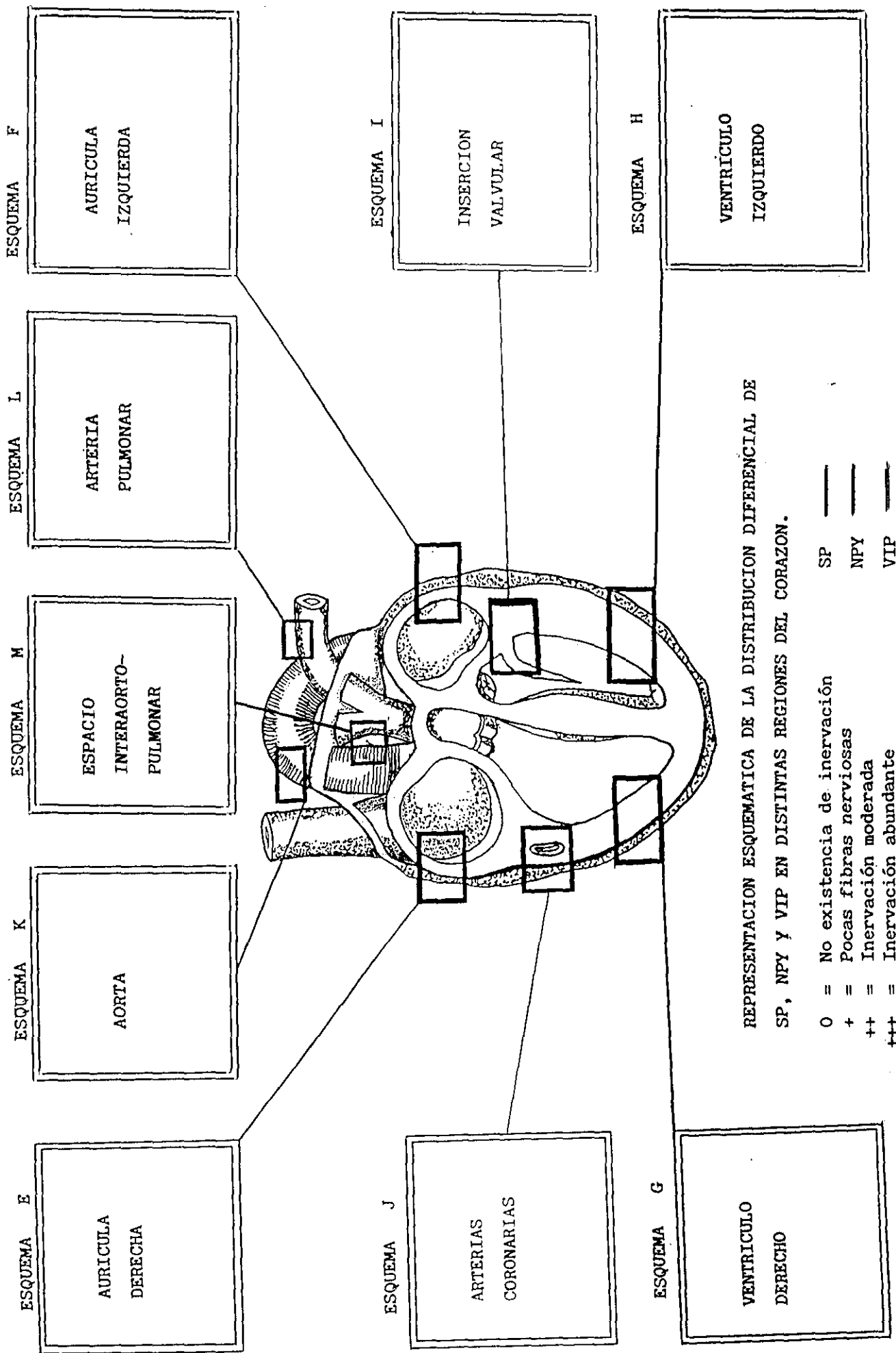
ESQUEMA C: RAMA DCHA: DEL HAZ



DISTRIBUCION DIFERENCIAL DE SP, NPY Y VIP EN NODO AV, HAZ AV, RAMAS DEL HAZ Y REGION DISTAL:

- O = No existencia de inervación
- + = Pocas fibras nerviosas
- ++ = Inervación moderada
- +++ = Inervación abundante

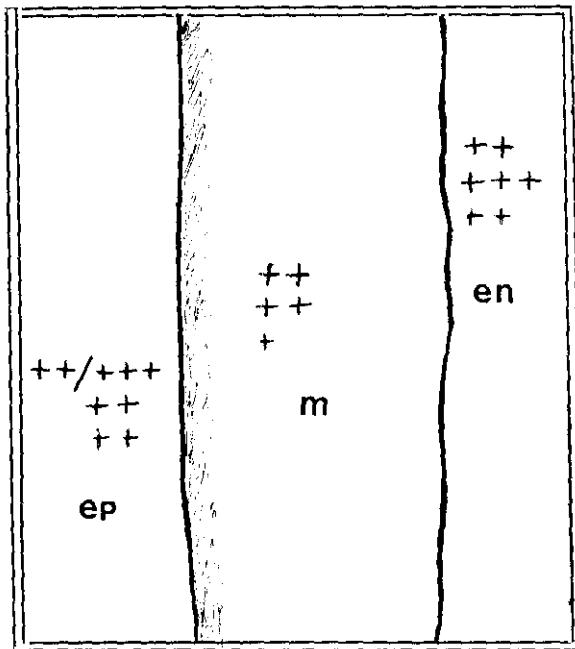
- SP ———
- NPY ———
- VIP ———



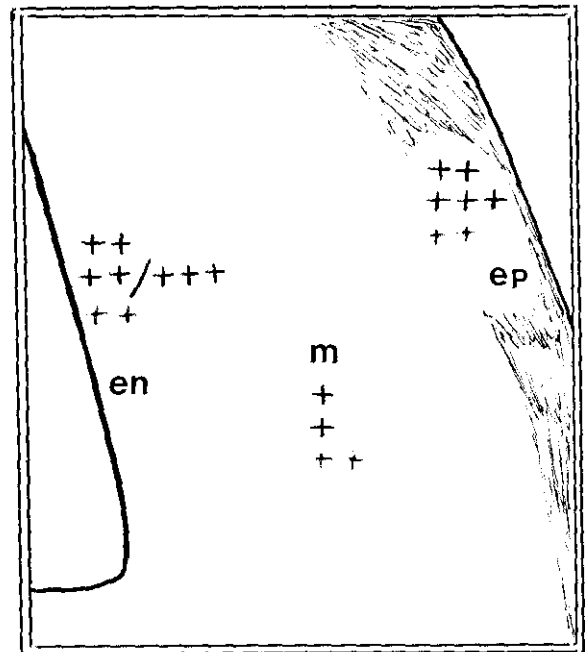
REPRESENTACION ESQUEMATICA DE LA DISTRIBUCION DIFERENCIAL DE SP, NPY Y VIP EN DISTINTAS REGIONES DEL CORAZON.

0 = No existencia de inervación SP —
 + = Pocas fibras nerviosas NPY —
 ++ = Inervación moderada VIP —
 +++ = Inervación abundante

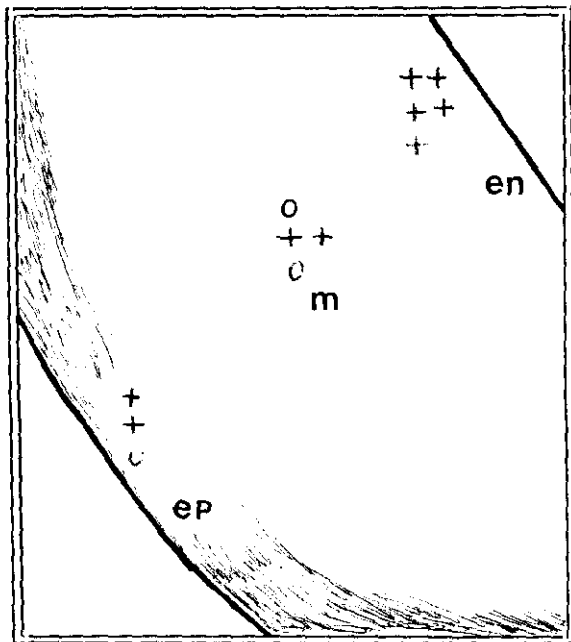
ESQUEMA E: AURICULA DERECHA



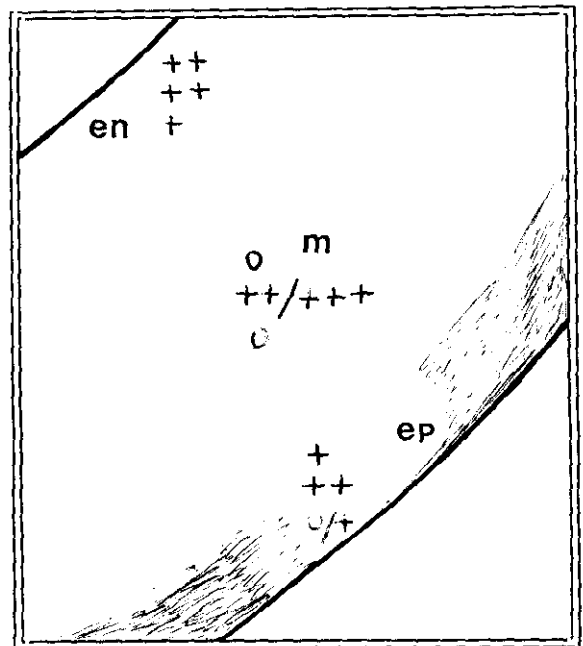
ESQUEMA F: AURICULA IZQUIERDA



ESQUEMA G: VENTRICULO DERECHO



ESQUEMA H: VENTRICULO IZQUIERDO

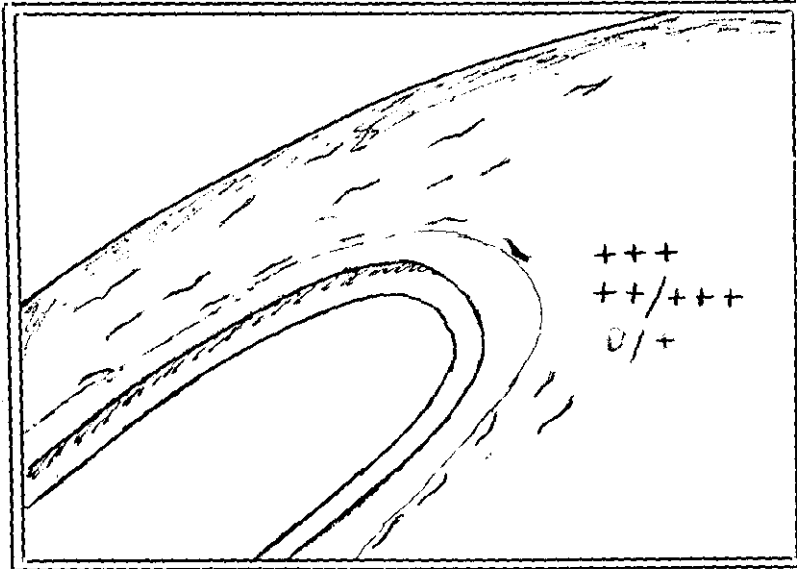


DISTRIBUCION DIFERENCIAL DE SP, NPY Y VIP EN PAREDES DE AD, AI, VD Y VI.

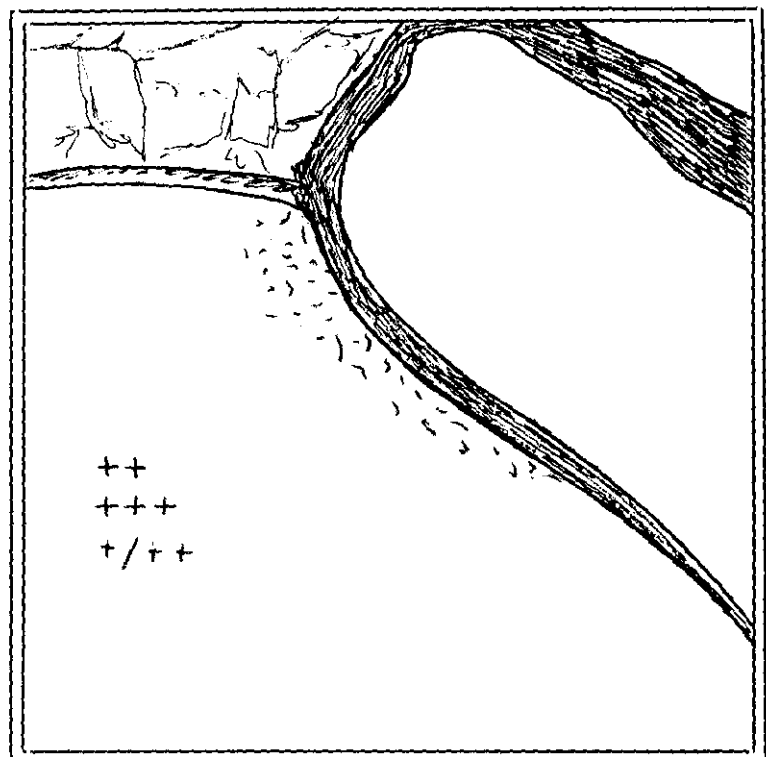
- 0 = No existencia de inervación
- + = Pocas fibras nerviosas
- ++ = Inervación moderada
- +++ = Inervación abundante

- SP ———
- NPY ———
- VIP ———

ESQUEMA J: ARTERIAS CORONARIAS



ESQUEMA I: INERVACION VALVULAR

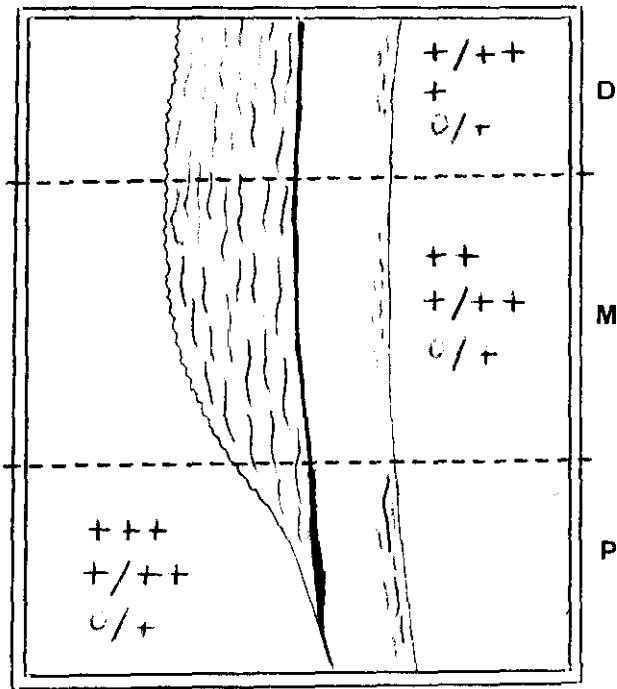


DISTRIBUCION DIFERENCIAL DE SP, NPY Y VIP EN ARTERIAS CORONARIAS Y APARATO VALVULAR.

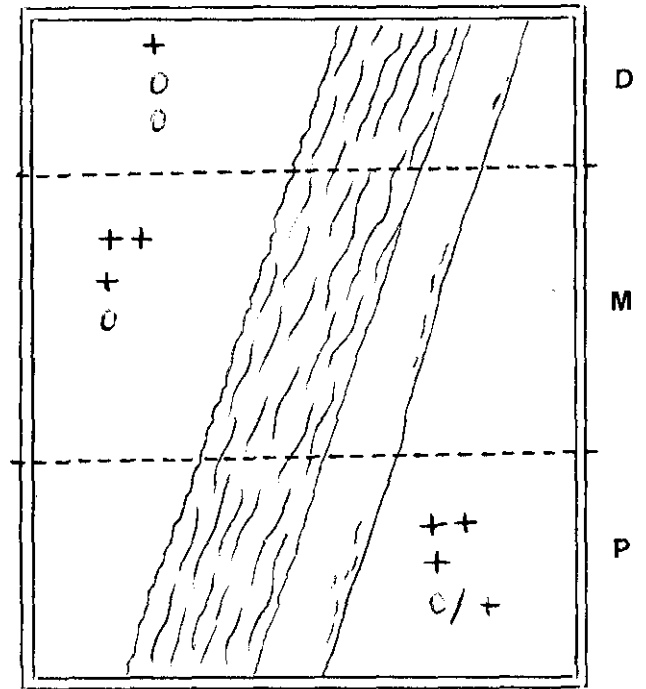
0 = No existencia de inervación
 + = Pocas fibras nerviosas
 ++ = Inervación moderada
 +++ = Inervación abundante

SP ———
 NPY ———
 VIP ———

ESQUEMA K: AORTA

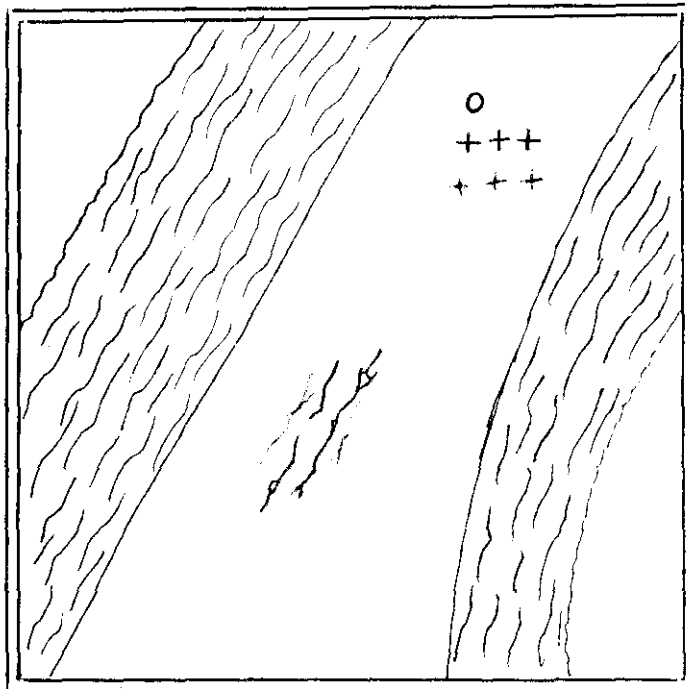


ESQUEMA L: ARTERIA PULMONAR



ESQUEMA M:

ESPACIO INTERAORTOPULMONAR



SP ———
 NPY ———
 VIP ———

DISTRIBUCION DIFERENCIAL DE SP, NPY Y VIP EN AORTA, ARTERIA PULMONAR Y ESPACIO INTERAORTOPULMONAR.

0 = No existencia de inervación
 + = Pocas fibras nerviosas
 ++ = Inervación moderada
 +++ = Inervación abundante

P = Proximal
 M = Medio
 D = Distal

III) EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON 6-HIDROXIDOPAMINA.

Los resultados obtenidos tras el tratamiento de los animales con 6-OH-DA fueron diferentes según los distintos esquemas de tratamiento. Mientras que dosis totales de 75 mg/kg no mostraron diferencias de inervación NPY-IR entre animales tratados y los no tratados, con dosis totales tanto de 150 mg/kg como de 500 mg/kg observamos una reducción significativa en el contenido y distribución de NPY en las diversas zonas del corazón.

La densa inervación observada en el sistema de conducción de animales no tratados (Figs. 4,15,17,18,26 a 30), experimentó una marcada reducción tras el tratamiento. Así, en nodo AV (Fig. 103) y fundamentalmente en el haz AV (Fig. 104), sólo pudieron identificarse fibras aisladas NPY-IR.

También en ambos ventrículos, la reducción de los terminales nerviosos NPY-IR fue prácticamente completa (Fig. 105). Del mismo modo, una reducción marcada o incluso desaparición completa (Fig. 106) de inervación NPY-IR se identificó en torno a las arterias coronarias.

En el espacio interaortopulmonar, se objetivaron fibras nerviosas NPY-IR con disposición y morfología similar a las encontradas en animales no tratados y con una inmunorreactividad intensa (Fig. 107).

Por el contrario, en aurículas, observamos una considerable densidad de fibras nerviosas NPY-IR (Figs. 108 y 109) aunque mucho menor que en los animales no tratados. En ocasiones, las fibras se dispusieron agrupadas en zonas determinadas, fundamentalmente en la zona subepicárdica con ausencia de las mismas en endocardio y miocardio (Fig. 110). También se identificaron acúmulos de fibras NPY-IR en la zona superior del septum interauricular (Fig. 111).

- EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON 6-OH-DA SOBRE LA DISTRIBUCIÓN DE SP Y VIP

Una vez observados los efectos del tratamiento con 6-OH-DA sobre la distribución de NPY en las distintas regiones cardíacas, valoramos el efecto de esta sustancia sobre las fibras nerviosas SP- y VIP-IR.

La administración intraperitoneal de una dosis total de 150 mg/kg de 6-OH-DA (a dosis de 50, 50 y 50 mg/kg los días 1, 2 y 7) a un grupo de cinco ratas, no originó alteraciones significativas en la densidad y distribución de fibras nerviosas SP-IR en el corazón. Así, la inmunorreactividad para SP fue semejante tanto en ratas tratadas como en las no tratadas en todas las zonas estudiadas del corazón y grandes vasos: haz AV (Fig. 112), porción superior del septum interauricular (Fig. 113), AD (Fig. 114), AI (Fig. 115), inserción de la válvula Mitral (Fig. 116), arterias coronarias (Figs. 117 y 118).

Del mismo modo, en los corazones de ratas tratadas con las mismas dosis de 6-OH-DA, no observamos modificación en la densidad y distribución de fibras nerviosas VIP-IR en ninguna de las zonas estudiadas: nodo AV (Fig. 119), rama izquierda del haz (Figs. 120 y 121), AI (Fig. 122), arterias coronarias (Fig. 123).

TRATAMIENTO CON 6-OH-DA. NPY.

Fig. 103. Nodo AV de un animal tratado con una dosis total de 150 mg/kg de 6-OH-DA. Reducción de fibras nerviosas NPY-IR (20 x).

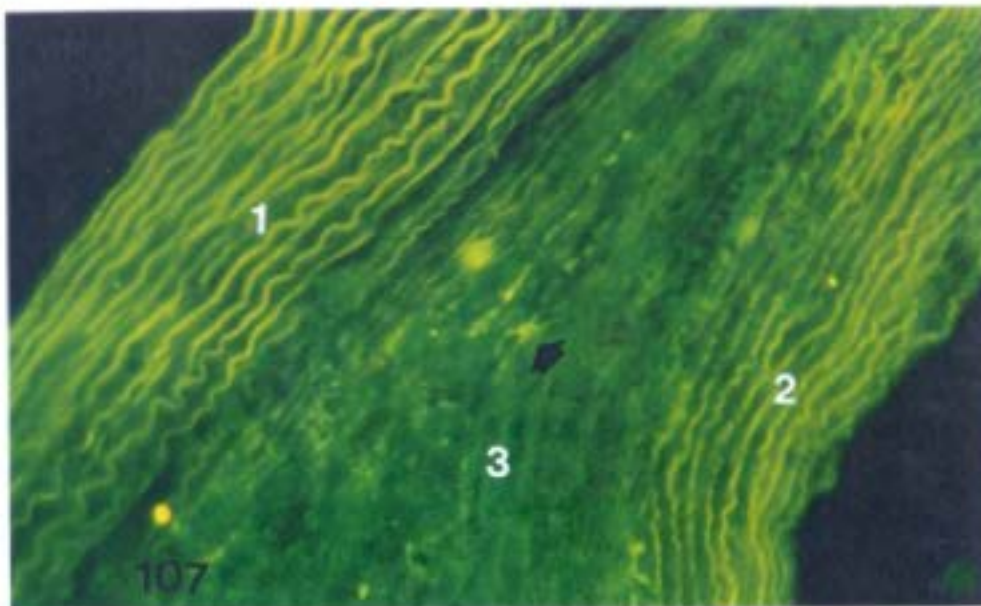
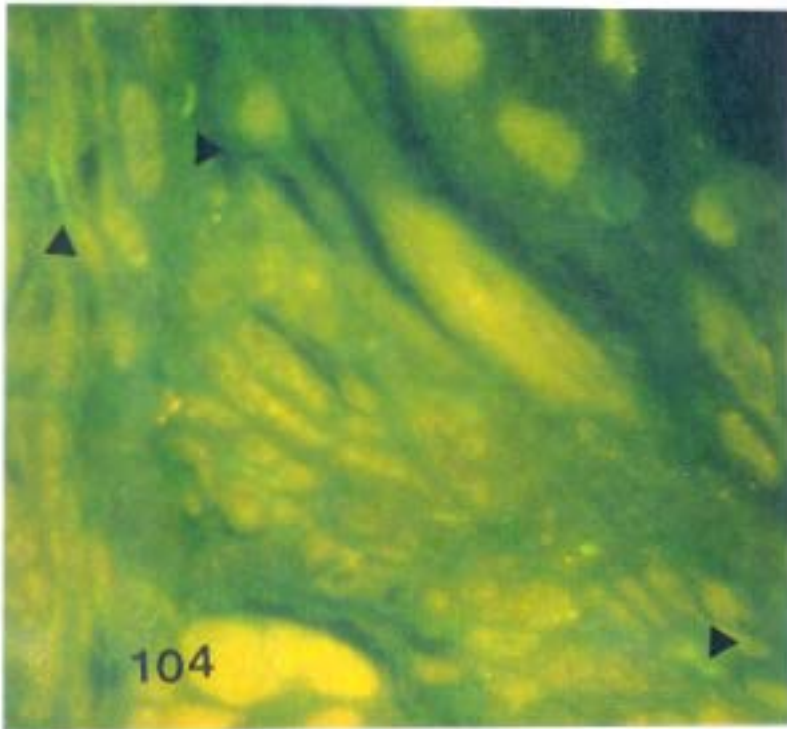
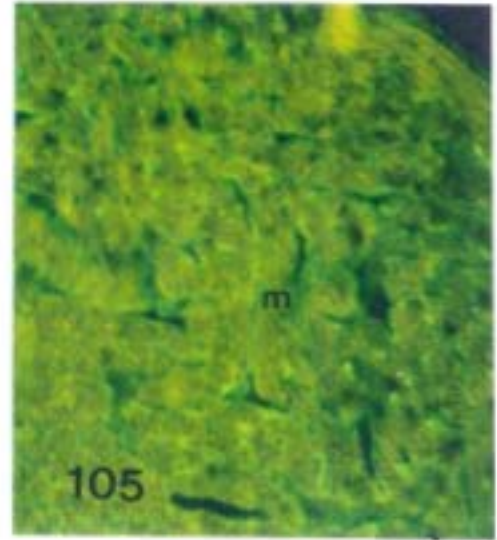
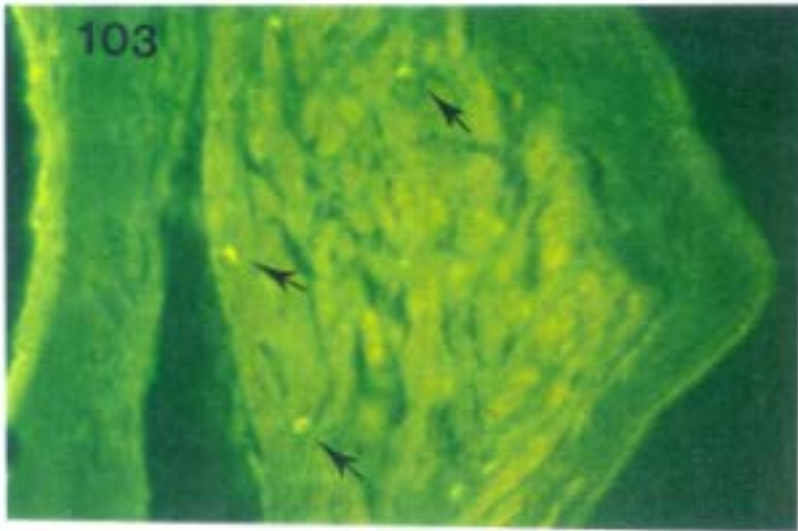
Fig. 104. Porción proximal del haz AV. Clara reducción de inervación NPY-IR con existencia de fibras aisladas (flechas) tras tratamiento con 150 mg/kg de 6-OH-DA (20 x).

Fig. 105. Ausencia de inervación NPY-IR en miocardio (m) de VI (20 x).

Fig. 106. Arteria coronaria (c). Tras tratamiento con una dosis total de 150 mg/kg de 6-OH-DA, no se observan fibras nerviosas NPY-IR; la flecha muestra una fibra nerviosa aislada (40 x).

Fig. 107. Espacio interaortopulmonar. El tratamiento con 150 mg/kg de 6-OH-DA no ha hecho desaparecer la inervación NPY-IR (20 x).

- 1: Aorta
- 2: Arteria pulmonar
- 3: Espacio interaortopulmonar



TRATAMIENTO CON 6-OH-DA. NPY.

Fig. 108. NPY. Aurícula Derecha. La 6-OH-DA ha reducido sustancialmente la inmunorreactividad de las fibras nerviosas (flechas) (20 x).

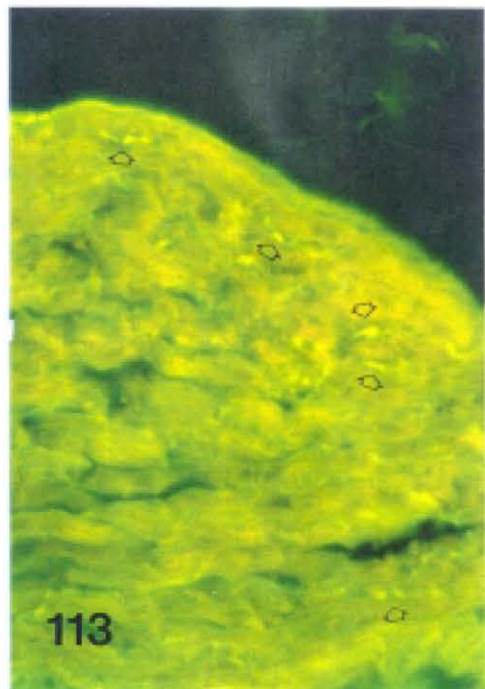
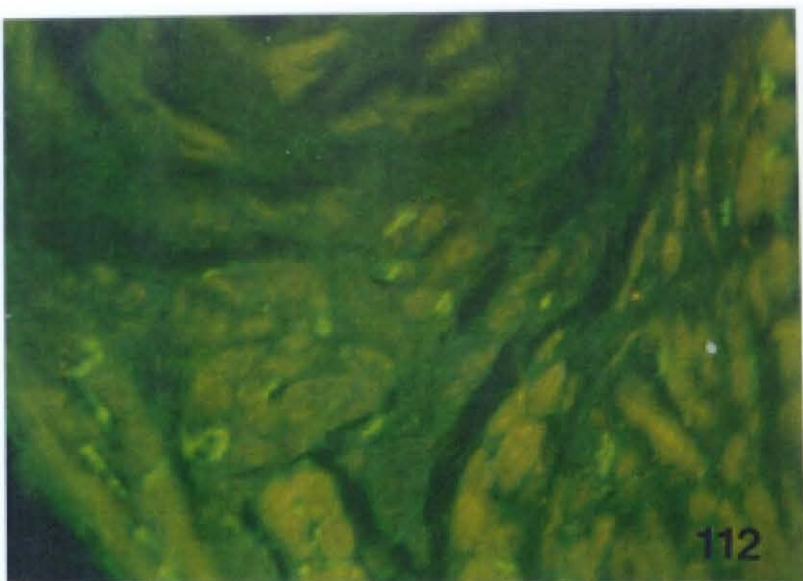
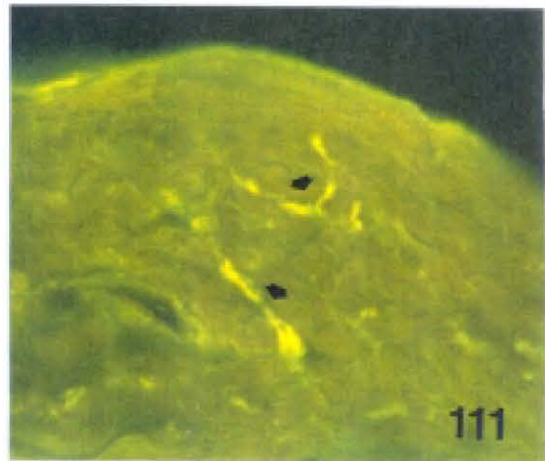
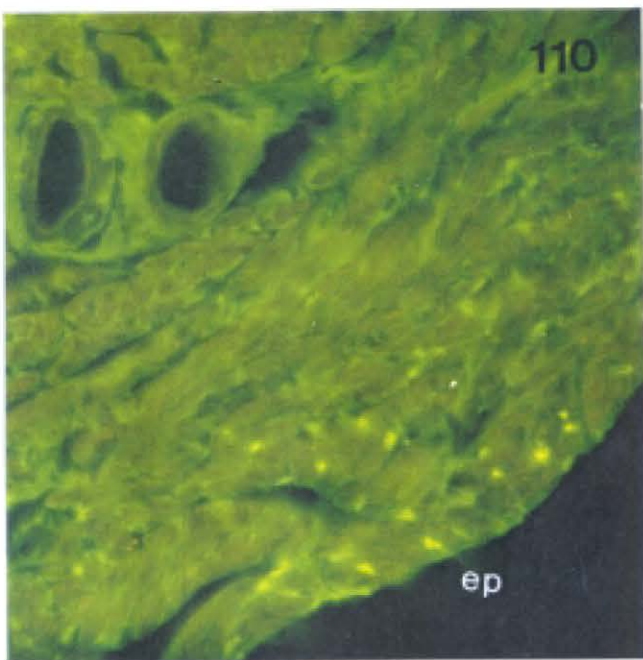
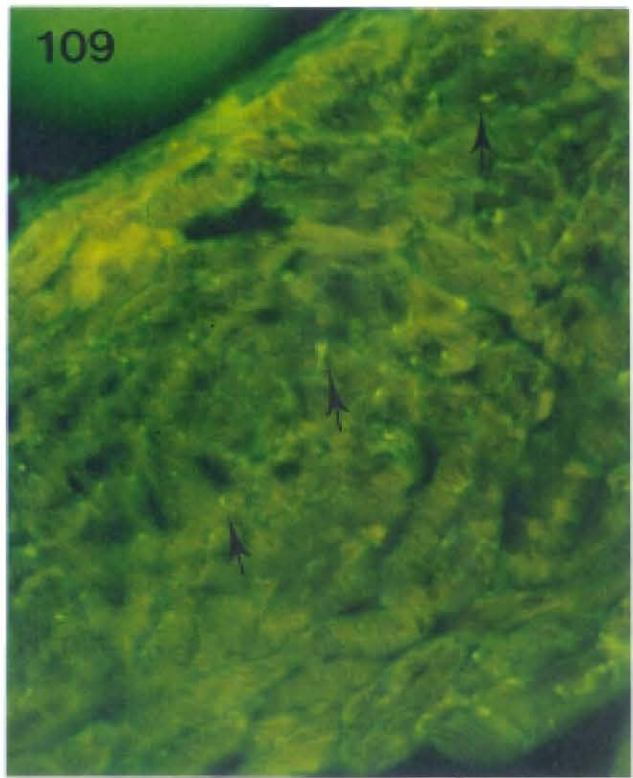
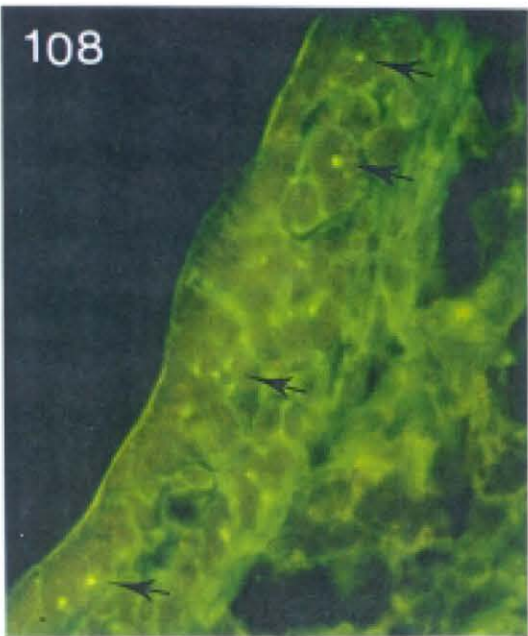
Fig. 109. 6-OH-DA y NPY. Aurícula izquierda tras tratamiento con una dosis total de 150 mg/kg de 6-OH-DA (20 x).

Fig. 110. Persistencia de fibras nerviosas NPY-IR a nivel de subepicardio (ep) de aurícula izquierda, con ausencia en miocardio y subendocardio después de tratamiento con 500 mg/kg de 6-OH-DA (dosis total) (20 x).

Fig. 111. Acúmulo de fibras nerviosas NPY-IR en la zona superior del septum interauricular tras tratamiento con 150 mg/kg de 6-OH-DA (flechas) (40 x).

Fig. 112. Efectos del tratamiento con 6-OH-DA sobre SP (150 mg/kg). Fibras nerviosas SP-IR a nivel del haz AV sin diferencias respecto a los animales no tratados (20 x).

Fig. 113. 6-OH-DA (150 mg/kg) y SP. Septum interauricular con fibras nerviosas SP-IR (flechas) (20 x).



TRATAMIENTO CON 6-OH-DA. SP.

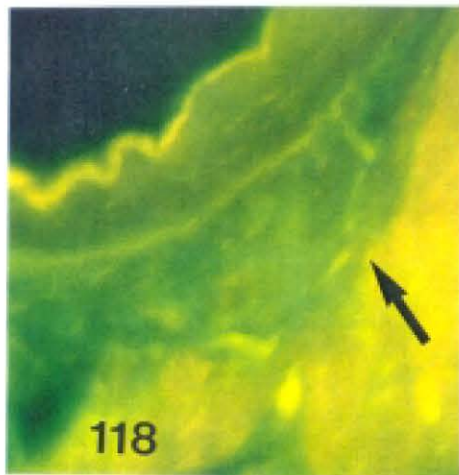
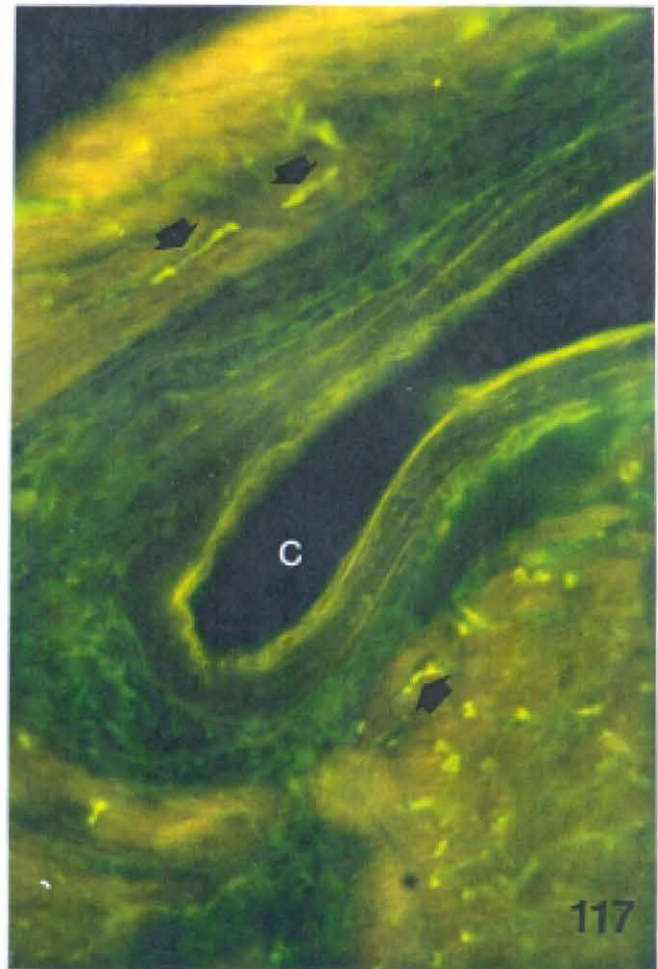
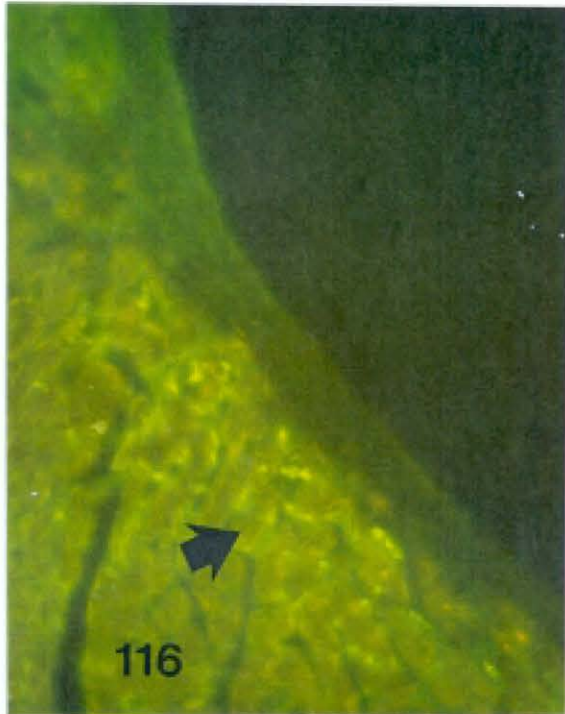
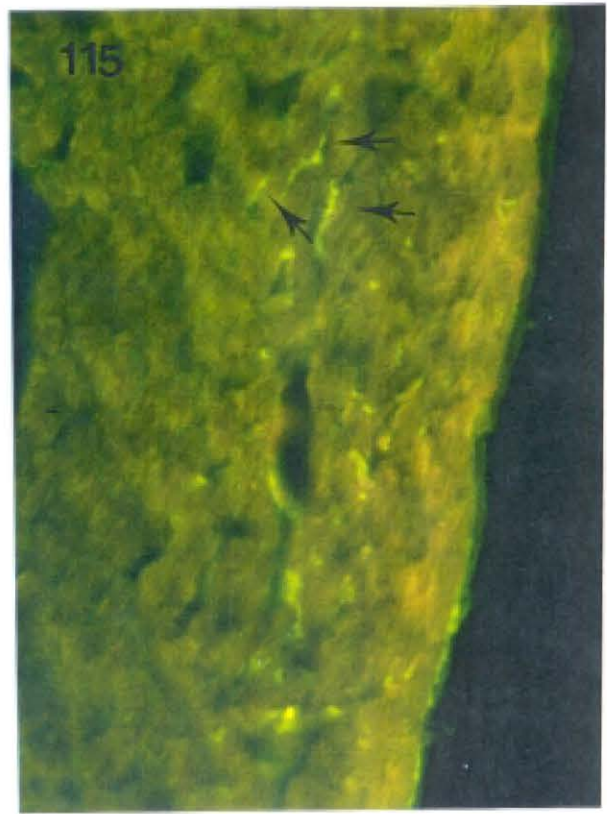
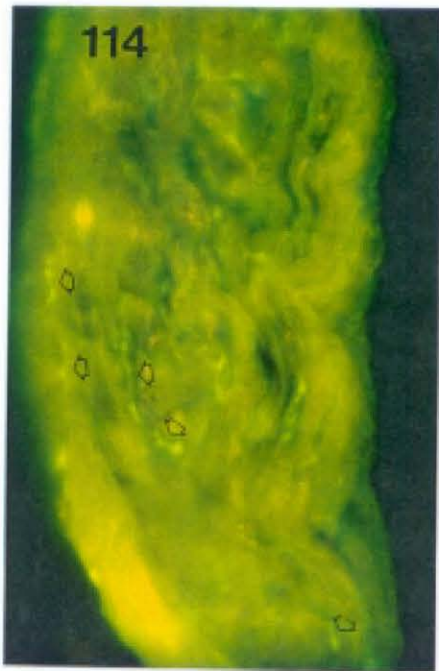
Fig. 114. 6-OH-DA (150 mg/kg) y SP. Aurícula derecha. Persistencia de fibras nerviosas SP-IR (flechas) (20 x).

Fig. 115. 6-OH-DA (150 mg/kg) y SP. Aurícula izquierda positiva (flechas) (20 x).

Fig. 116. 6-OH-DA (150 mg/kg) y SP. El tratamiento con 6- OH-DA no modificó la densidad de inervación SP-IR a nivel de la inserción de la valva septal de la válvula Mitral (20 x).

Fig. 117. 6-OH-DA (150 mg/kg) y SP. Arteria coronaria (C) izquierda con similar inmunorreactividad para SP que en ratas no tratadas (flechas) (20 x).

Fig. 118. 6-OH-DA (150 mg/kg) y SP. Detalle a mayor aumento de fibra nerviosa SP-IR (flecha) a nivel de la adventicia de la arteria coronaria derecha tras tratamiento con 6-OH-DA (40 x).



TRATAMIENTO CON 6-OH-DA. VIP.

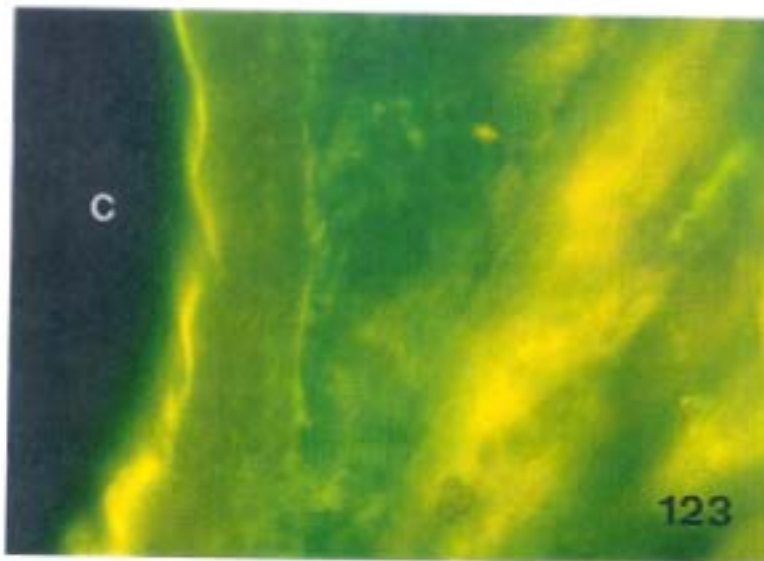
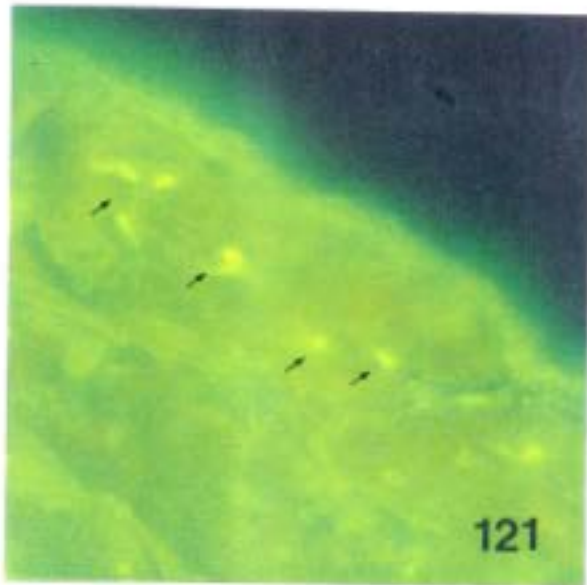
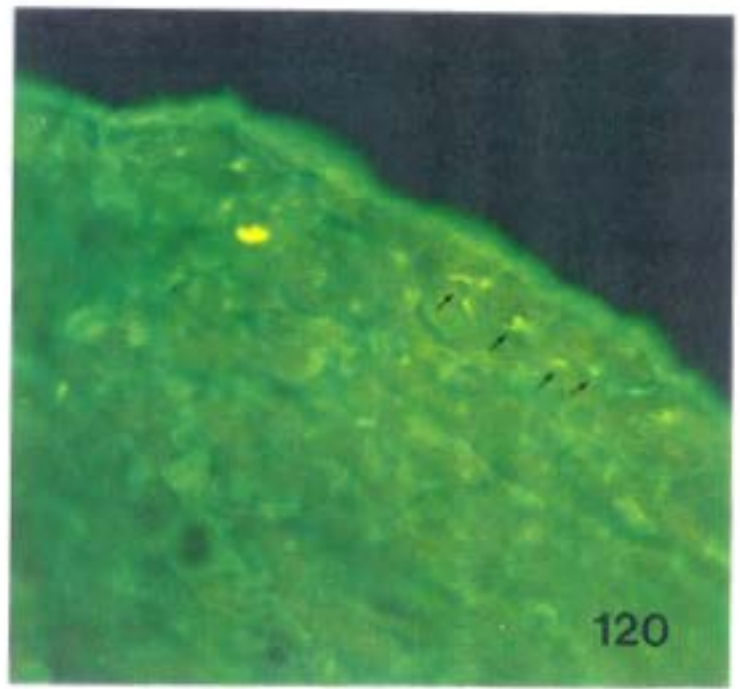
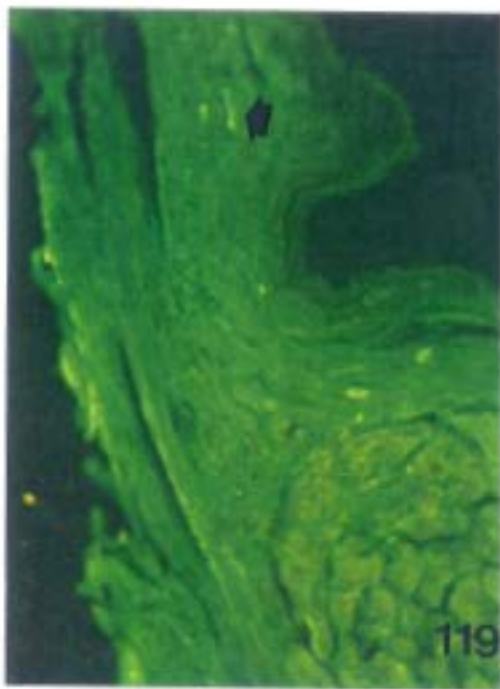
Fig. 119. Efecto del tratamiento con 6-OH-DA (150 mg/kg) sobre la innervación VIP-IR en el nodo AV. Existencia de fibras positivas (flecha) (20 x).

Fig. 120. 6-OH-DA (150 mg/kg) y VIP. El tratamiento con 6-OH-DA no alteró la innervación VIP-IR a nivel de la rama izquierda del haz (20 x).

Fig. 121. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 122. 6-OH-DA (150 mg/kg) y VIP. Persistencia de fibras nerviosas VIP-IR a nivel de región subepicárdica de AI (20 x).

Fig. 123. 6-OH-DA (150 mg/kg) y VIP. Arteria coronaria (C) izquierda (40 x).



IV) EFECTOS DEL TRATAMIENTO CON CAPSAICINA.

El tratamiento sistémico con capsaicina por vía subcutánea a dosis totales de 260 mg/kg (distribuidos en 4 dosis sucesivas de 40, 40, 80 y 100 mg/kg) hizo desaparecer prácticamente la totalidad de los terminales nerviosos SP-IR en todas las zonas del corazón: Nodo SA (Fig. 124), nodo AV (Fig. 125), haz AV (Fig. 126) y sus ramas (Fig. 127), AD y AI (Figs. 128 a 130), alrededor de las arterias coronarias (Fig. 131) y grandes vasos (Figs. 132 y 133).

Solamente en la porción superior del septum interauricular se pudieron identificar fibras aisladas SP-IR con densidad semejante a la encontrada en animales no tratados (Fig. 134) sin identificar tampoco acúmulos de fibras con orientación especial ni cuerpos celulares (Figs. 7 a 9).

Dosis totales de capsaicina de 125 mg/kg empleadas en el primer esquema de tratamiento no modificaron el patrón de distribución de SP en el corazón (Fig. 135).

La distribución de las fibras nerviosas NPY- y VIP-IR tras tratamiento con dosis totales de 260 mg/kg de capsaicina no mostró cambios significativos respecto a los animales no tratados en el sistema de conducción (NPY: Figs. 136 a 140; VIP: Figs. 141 y 142); aurículas (NPY: Fig. 143; VIP: 144) ni septum interauricular (NPY: Fig. 145; VIP: Figs. 146 y 147).

Un hecho característico en cuanto a la inervación NPY-IR de las paredes ventriculares es que en aquellos animales tratados con capsaicina, la densidad de inervación fue menor tanto en el miocardio (Figs. 148 y 149) como alrededor de las arterias coronarias (Fig. 150). En estas últimas, las fibras nerviosas NPY-IR fueron menos abundantes que en los animales no tratados y no se objetivaron troncos nerviosos.

TRATAMIENTO CON CAPSAICINA

Fig. 124. Nodo SA. Ausencia de inervación SP-IR tras tratamiento con dosis totales de 260 mg/ kg de capsaicina (asterisco: arteria central del nodo) (20 x).

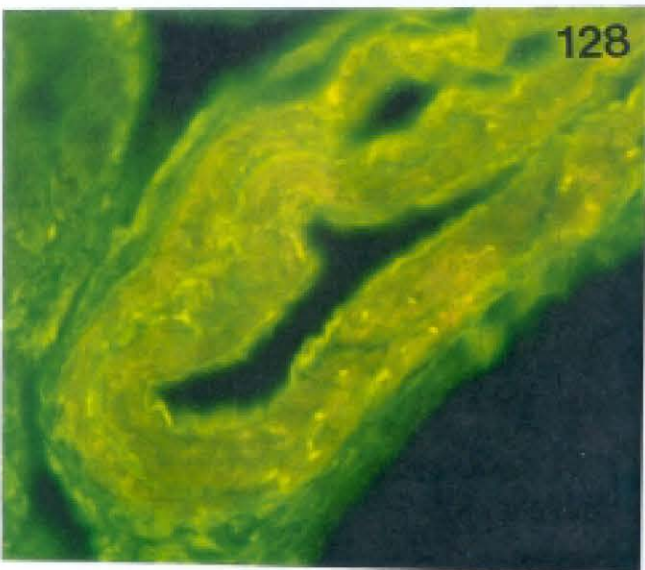
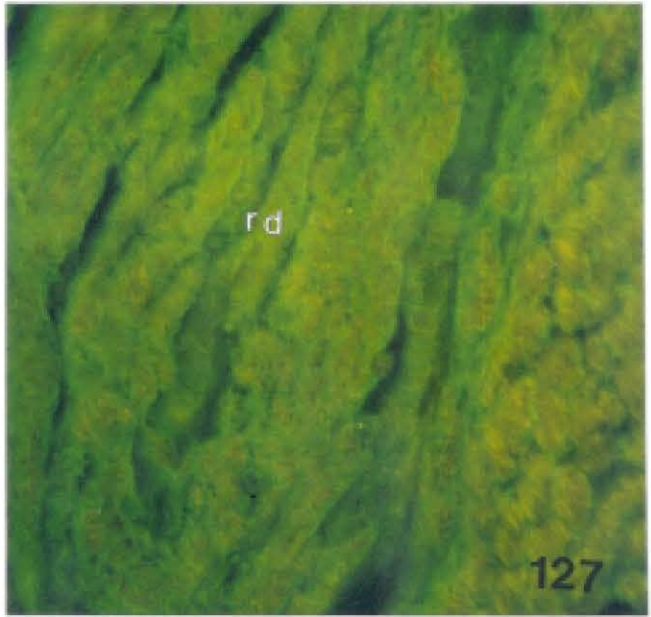
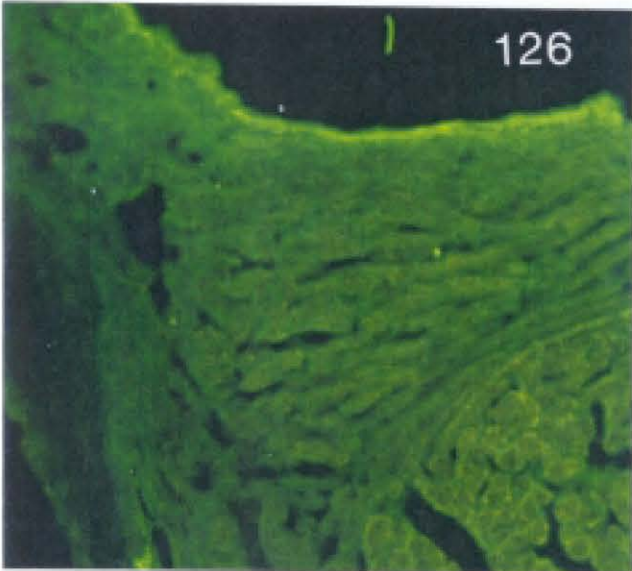
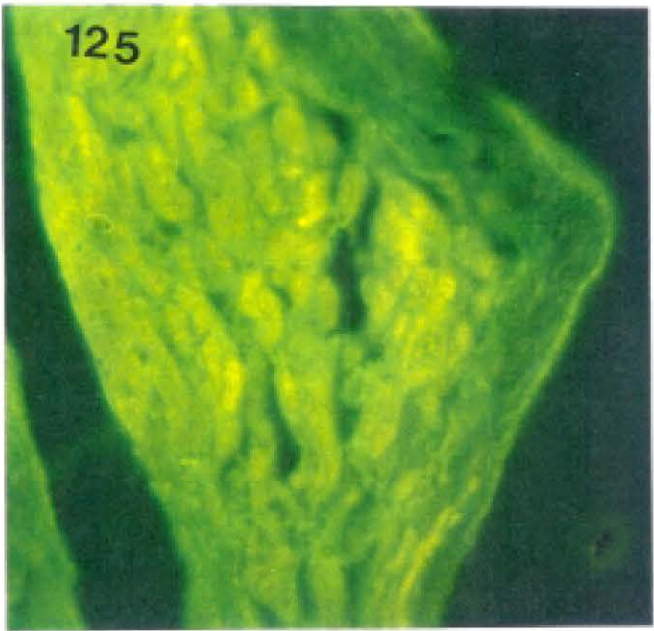
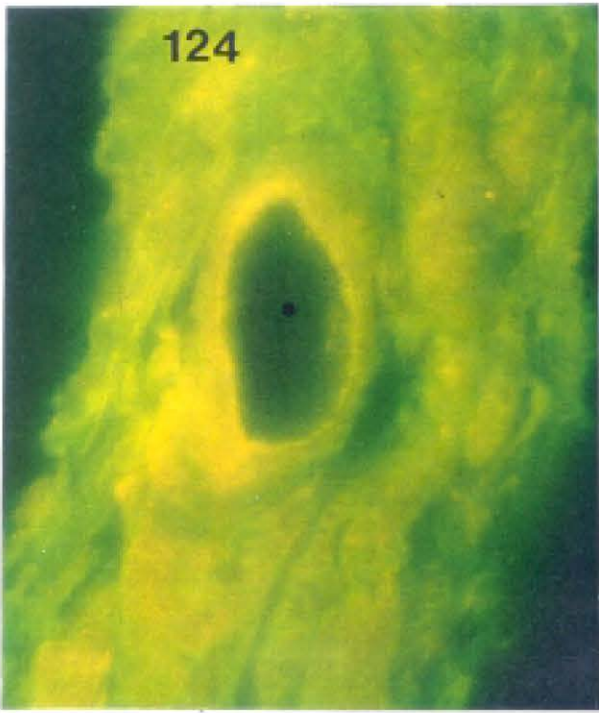
Fig. 125. Nodo AV negativo para SP tras capsaicina (260 mg/kg) (20 x).

Fig. 126. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Haz AV negativo para SP (20 x).

Fig. 127. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Rama derecha (rm) del haz negativa para SP (20 x).

Fig. 128. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Aurícula Derecha negativa para SP (20 x).

Fig. 129. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Aurícula Izquierda negativa para SP (20 x).



TRATAMIENTO CON CAPSAICINA

Fig. 130. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Aurícula Derecha negativa para SP (20 x).

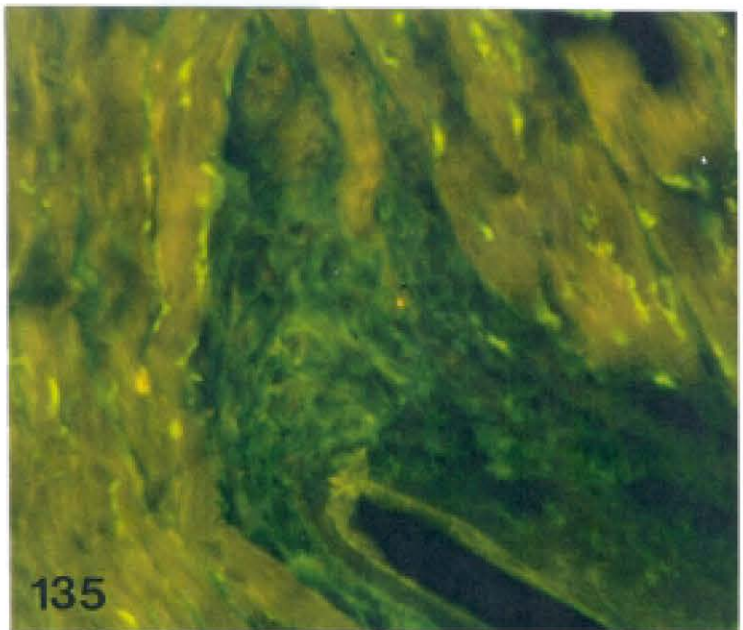
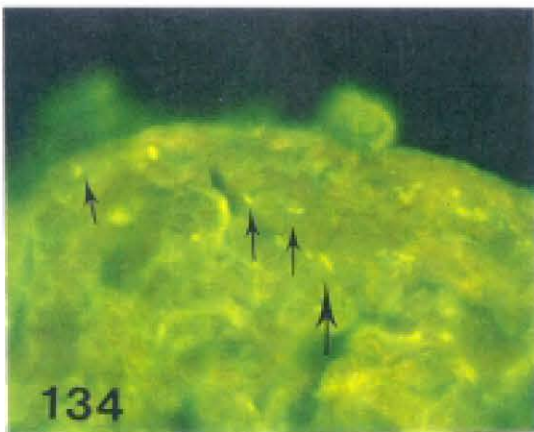
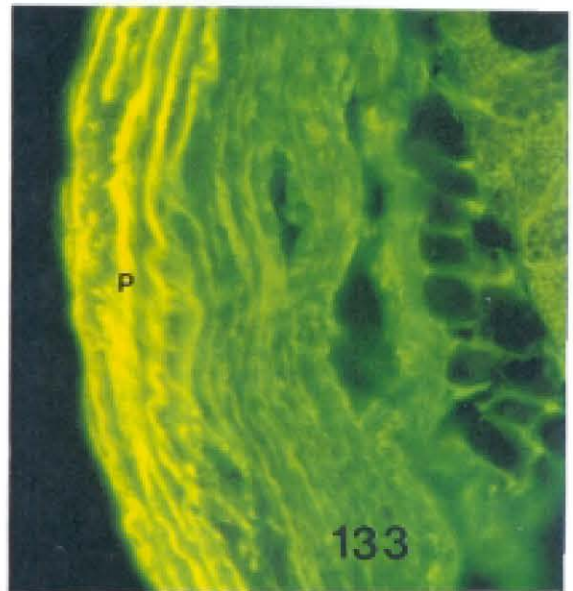
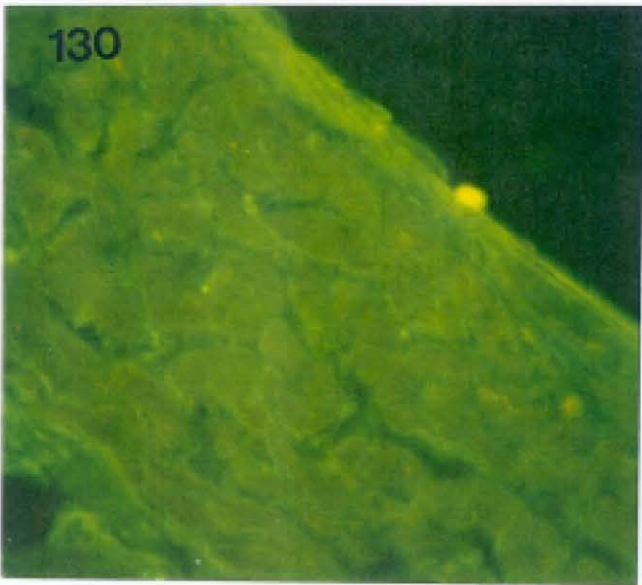
Fig. 131. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Arteria coronaria (C) izquierda sin inmunorreactividad para SP (20 x).

Fig. 132. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Aorta (A) ascendente negativa para SP (20 x).

Fig. 133. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Arteria pulmonar (P) negativa para SP (20 x).

Fig. 134. Persistencia de fibras nerviosas SP-IR a nivel de la porción superior del septum interauricular tras tratamiento con capsaicina (260 mg/kg) (flechas) (20 x).

Fig. 135. Tratamiento con capsaicina (125 mg/kg). Persistencia de fibras nerviosas SP-IR en arteria coronaria izquierda (C) (20 x).



TRATAMIENTO CON CAPSAICINA

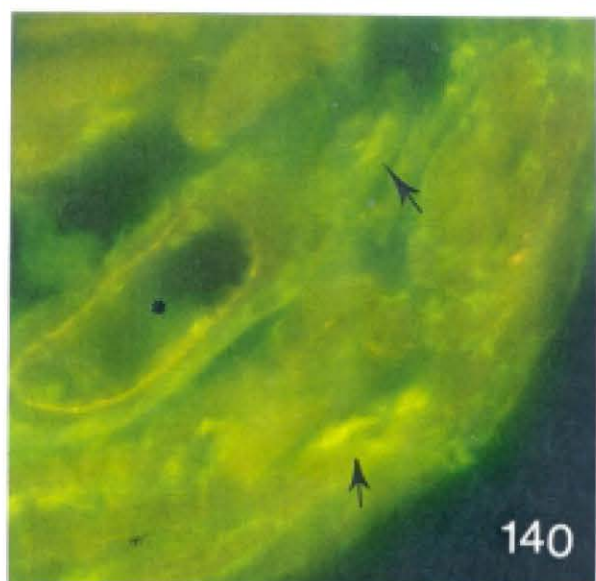
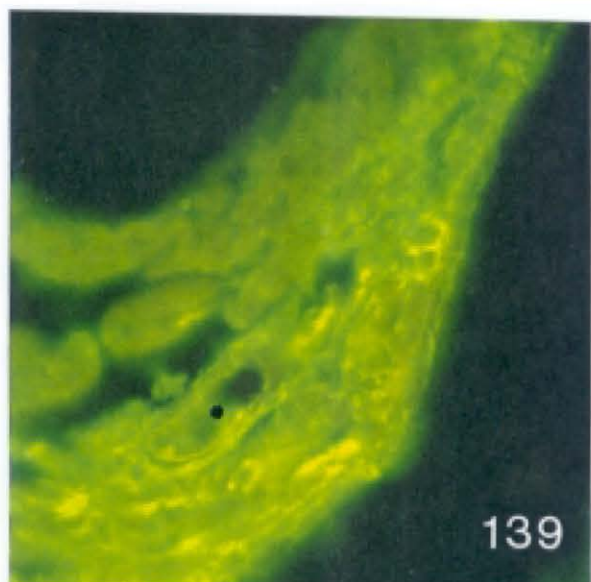
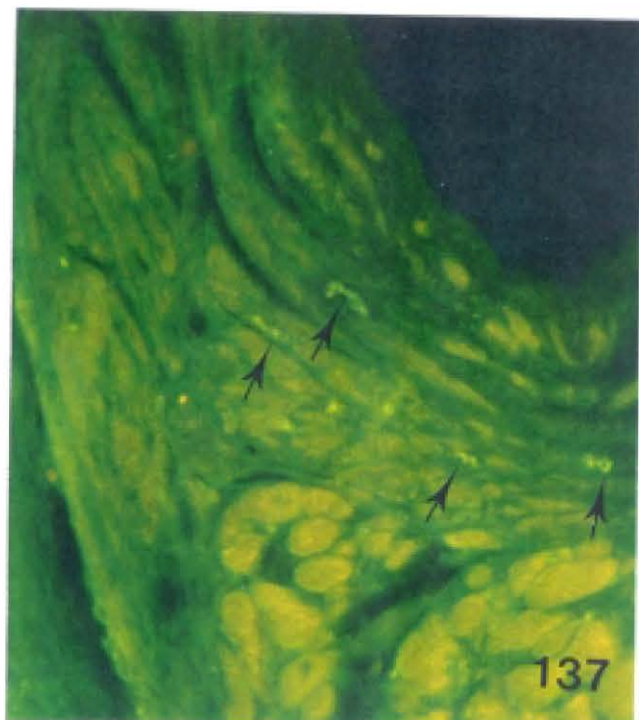
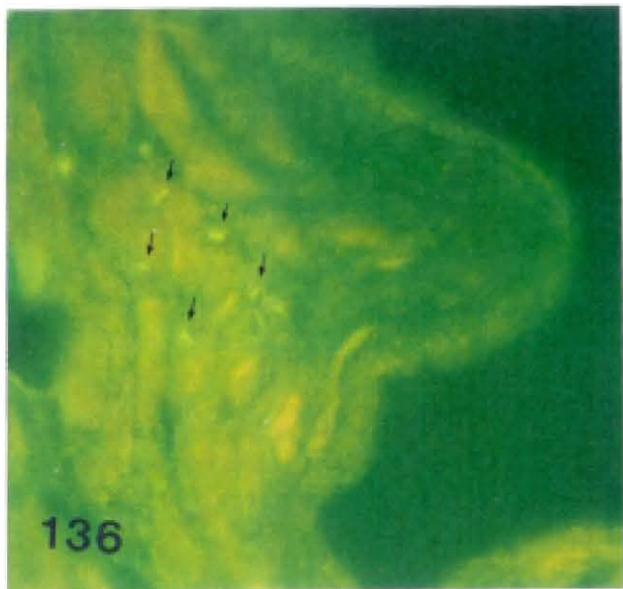
Fig. 136. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Nodo AV positivo para NPY (flechas) (20 x).

Fig. 137. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Haz AV positivo para NPY (flechas) (20 x).

Fig. 138. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Rama derecha del haz positiva para NPY (flechas) (20 x).

Fig. 139. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Nodo SA positiva para NPY (asterisco: arteria central del nodo) (20 x).

Fig. 140. Detalle de la imagen anterior (40 x).



TRATAMIENTO CON CAPSAICINA

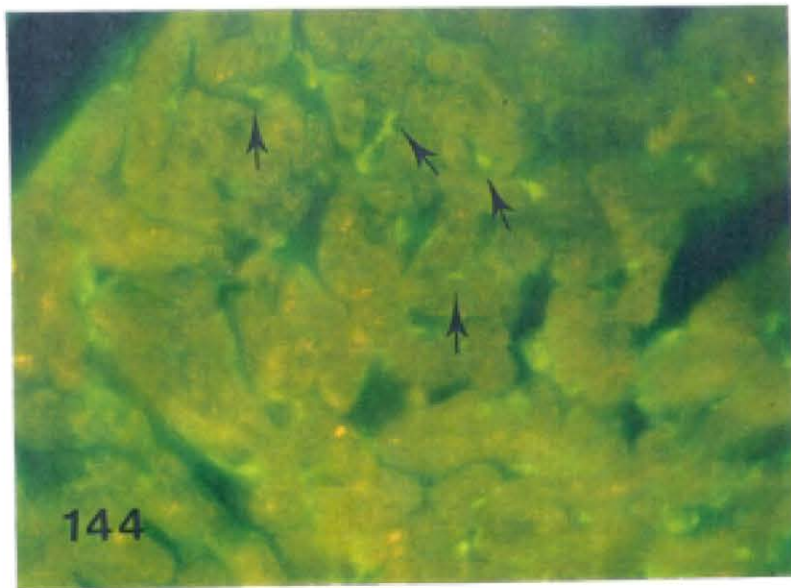
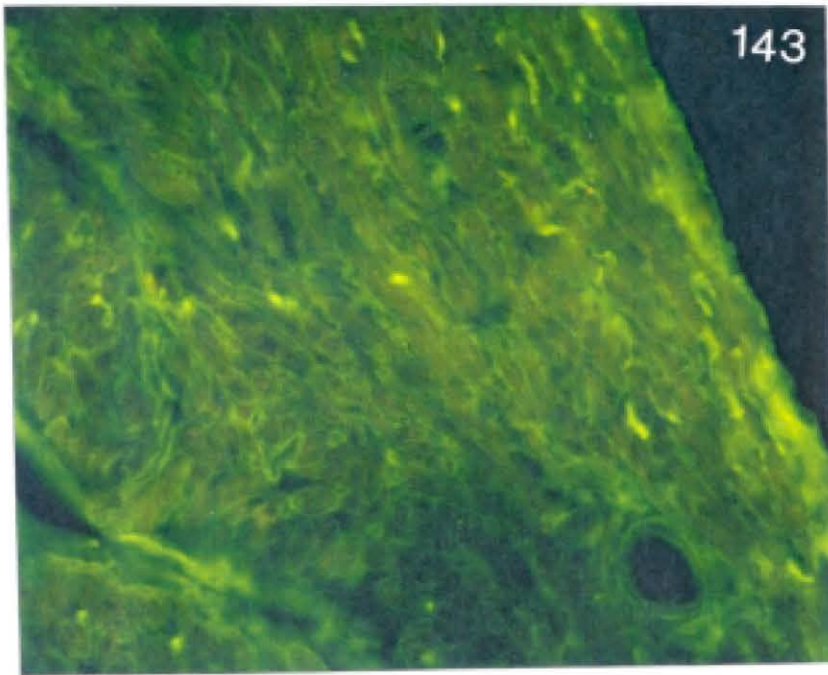
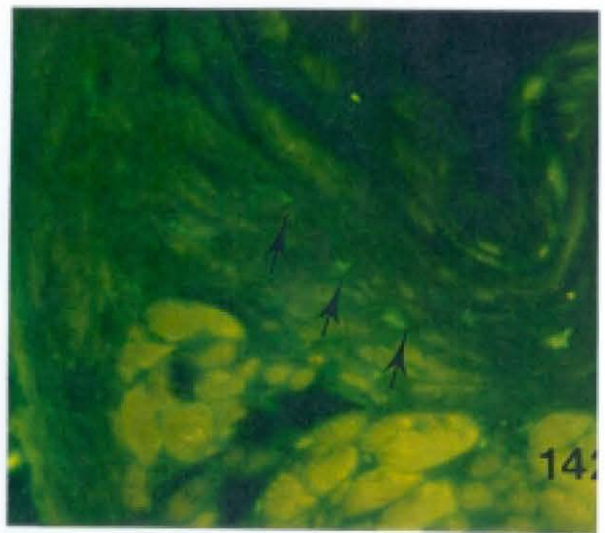
Fig. 141. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Nodo AV débilmente positivo para VIP (flechas) (20 x).

Fig. 142. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Haz AV positivo para VIP (flechas) (20 x).

Fig. 143. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Aurícula izquierda positiva para NPY (20 x).

Fig. 144. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Aurícula derecha positiva para NPY (flechas) (20 x).

Fig. 145. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Septum interauricular positivo para NPY (flecha) (20 x).



TRATAMIENTO CON CAPSAICINA

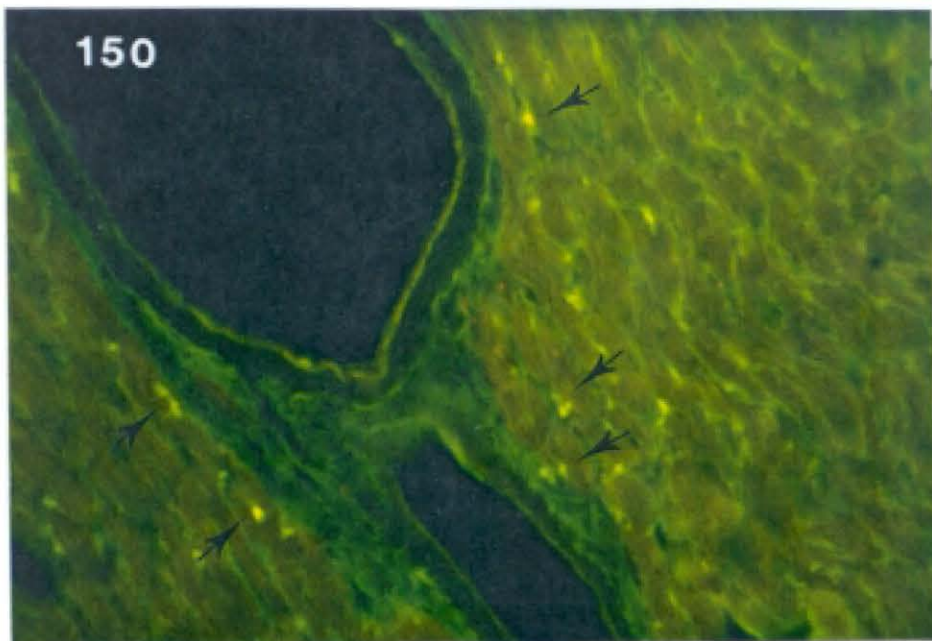
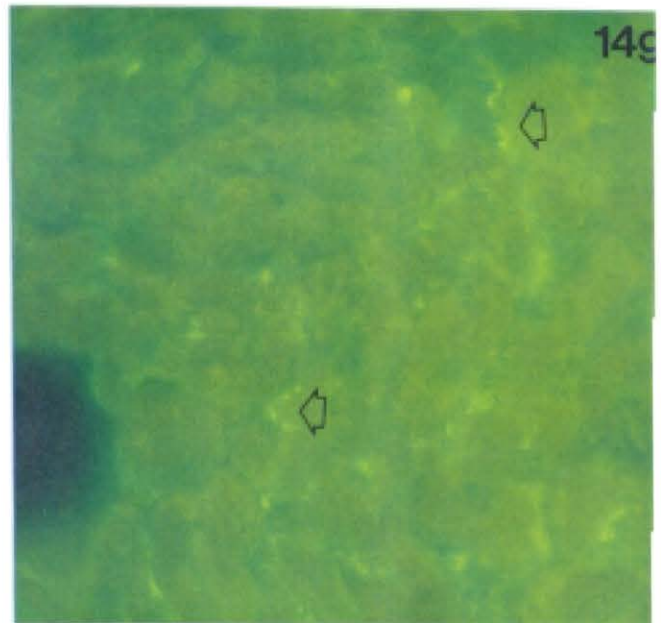
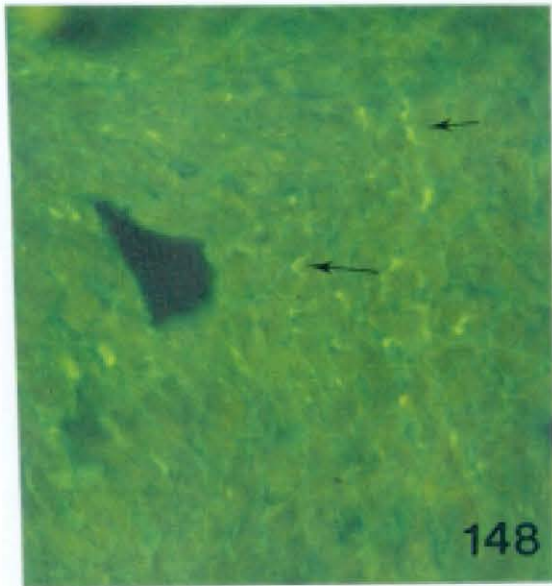
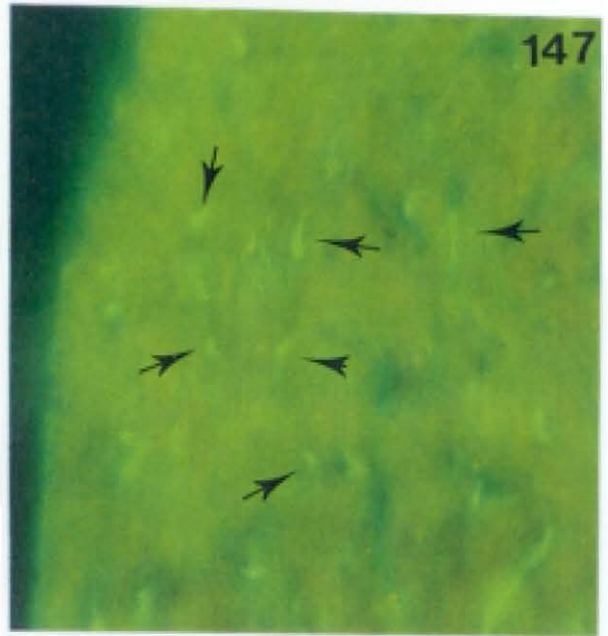
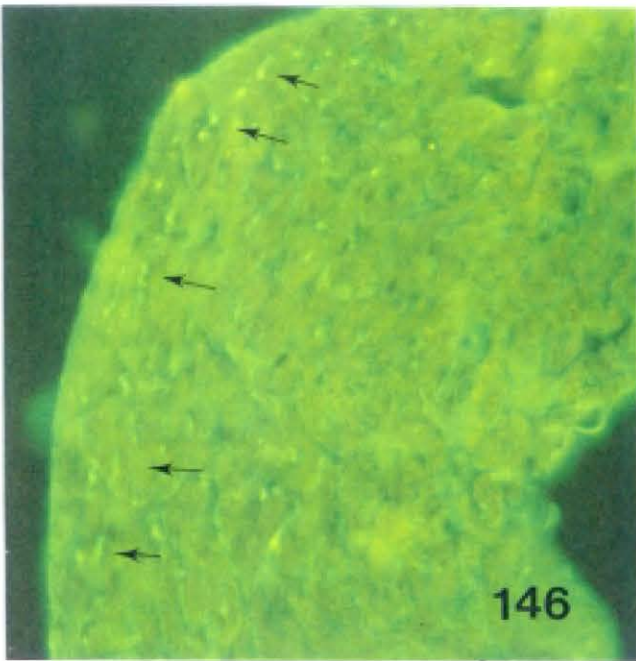
Fig. 146. Tratamiento con capsaicina (260 mg/kg). Septum interauricular positivo para VIP (flechas) (20 x).

Fig. 147. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 148. Reducción de fibras nerviosas NPY-IR tras tratamiento con 260 mg/kg de capsaicina (flechas) (20 x).

Fig. 149. Detalle de la imagen anterior (40 x).

Fig. 150. Reducción de fibras nerviosas NPY-IR tras tratamiento con capsaicina (260 mg/kg) (flechas) (20 x).



DISCUSSION

**D) PATRON DE DISTRIBUCION MORFOLOGICA DE SUSTANCIA P (SP),
NEUROPEPTIDO Y (NPY) Y PEPTIDO INTESTINAL VASOACTIVO (VIP).**

I.a.- SISTEMA DE CONDUCCION

El conocimiento de la anatomía de la inervación autonómica del sistema de conducción es fundamental para comprender los mecanismos de control neural de la función cardíaca. En diversas especies animales, se han demostrado fibras nerviosas eferentes y aferentes simpáticas y parasimpáticas que inervan los nodos SA y AV, el haz AV y sus ramas. Estudios morfológicos mediante técnicas de fluorescencia con ácido glioxílico e inmunotinción para Dopamina beta hidroxilasa (DA- β -OHasa) y Tirosina hidroxilasa han demostrado una densa inervación adrenérgica en dichas zonas (FORSGREN, 1988). Del mismo modo, el empleo de técnicas inmunohistoquímicas para la identificación de anticuerpos frente a la colina acetiltransferasa han evidenciado la existencia de una importante inervación del sistema de conducción de los mamíferos por nervios colinérgicos (PENG ET AL, 1981). Pero además, el empleo de técnicas inmunohistoquímicas ha permitido identificar la existencia de neurotransmisores peptidérgicos en los nervios que inervan el sistema de conducción del corazón (CORR, 1992).

a) **SP**

Así, del mismo modo que **WEIHE Y REINECKE (1981)** describieron un alto número de fibras nerviosas SP-IR en los nervios yuxta e intranodales de corazones de diversos mamíferos, nosotros en la rata, observamos una densa inervación SP-IR a lo largo de todo el sistema de conducción con la existencia de fibras y varicosidades SP-IR entre las células musculares y alrededor de la arteria central del nodo. Estos autores (**WEIHE Y REINECKE, 1981, 1983**) no detectaron fibras SP-IR que inervasen las células nodales. Por el contrario, **FORSGREN (1989b)** describe la existencia de fibras nerviosas, aunque en número pequeño, en la proximidad de las células nodales.

En nuestro estudio, la demostración morfológica de la inervación SP-IR del tejido de conducción cardíaco nos hace estar en desacuerdo con **GERSTHEIMER ET AL (1988)** para quienes, en su estudio morfométrico de la inervación cardíaca peptidérgica en cobayas, la densidad de fibras SP-IR fue semejante en el miocardio de la aurícula derecha que en el tejido de conducción. Hallazgos similares obtuvieron **WEIHE ET AL (1981, 1984)** que describieron terminaciones nerviosas aisladas adyacentes a los miocardiocitos localizándose la mayor densidad de inervación SP-IR alrededor de las arterias epicárdicas. En nuestro estudio, observamos una clara diferencia entre la inervación por fibras nerviosas SP-IR mayor en nodo SA respecto a la pared auricular adyacente.

Estamos de acuerdo con **WHARTON ET AL (1981)** en cuanto a la mayor densidad de inervación por fibras SP-IR alrededor de las porciones distales del sistema

de conducción respecto a los nodos SA y AV, distribuyéndose a ambos lados del septum interventricular, en las ramas derecha e izquierda del haz. Identificamos fibras nerviosas SP-IR tanto a nivel proximal como distal de ambas ramas.

Por el contrario, **FORSGREN (1989b)** analizó la distribución de las fibras nerviosas SP-IR en diversas partes del sistema de conducción del corazón bovino, encontrando que la mayor inervación se localizaba a nivel del haz AV, especialmente en las regiones donde los haces de fibras de Purkinje se ramifican y en los pequeños canales de tejido conectivo. Para este autor, la densidad de fibras SP-IR fue en total mucho menor en las ramas que en el haz AV.

Sin embargo, y a pesar de la demostrada existencia de inervación SP-érgica del sistema de conducción cardíaco, no están del todo bien definidas las implicaciones funcionales de este neuropéptido en el ciclo cardíaco. En la mayor parte de los estudios in vitro, SP no parece tener efecto directo sobre la frecuencia cardíaca (**LOSAY ET AL, 1977; LUNDBERG ET AL, 1985a**).

SP presenta un efecto cronotrópico negativo en el corazón de cobaya. La bradicardia se podría producir por unión de SP a receptores específicos existentes en los ganglios cardíacos parasimpáticos a través de la liberación de Ach endógena (**STANOVNIK, LOGENDER-MLINSEK Y ERJAVEC, 1986; DALSGAARD ET AL, 1986**). Así, SP puede estar implicado en el control parasimpático cardíaco, ya sea en un

asa aferente de un reflejo central o cuando se libera de los nervios sensitivos periféricos como parte de un reflejo axonal sensitivo-motor (CORR, 1992).

c) NPY

En cuanto a la distribución de NPY en el sistema de conducción, los resultados de FORSGREN (1989a,c) en el corazón bovino, demuestran fibras NPY-IR en todos los componentes del sistema de conducción. En los nodos SA y AV, las fibras tenían aspecto varicoso y con disposición homogénea, mientras que en el haz AV y sus ramas, la distribución fue más heterogénea acoplándose a la morfología de los haces de fibras de Purkinje y fundamentalmente en los espacios intercelulares donde éstas se ramifican.

En nuestro trabajo, también observamos una inervación homogénea de los nodos SA y AV con fibras nerviosas NPY-IR dispuestas de modo uniforme, pero a diferencia de estos autores, además de fibras NPY-IR varicosas a nivel del haz AV, encontramos una densa inervación de largas y gruesas fibras NPY-IR. Estas fibras discurrían paralelas a las fibras de Purkinje con una IR muy intensa.

No estamos de acuerdo con los datos de STERNINI Y BRECHA (1985) en cobayas y de GU ET AL (1984) en ratón y rata que demostraron fibras nerviosas NPY-IR en las regiones de los nodos SA y AV en cantidades mayores que en el miocardio que las rodea. Por el contrario nosotros, al igual que GERSTHEIMER ET AL (1988) en cobaya, observamos una densidad semejante de fibras nerviosas NPY-IR en el miocardio de aurícula derecha y en el nodo SA, con inmunorreactividad muy intensa y superior a

la de SP. La baja densidad de inervación NPY-IR en el haz de His no fue diferente a la del miocardio auricular, dato también observado en humanos (**WEIHE ET AL, 1981**).

Los valores más altos de fibras NPY-IR se han observado alrededor de los vasos; no obstante, la inervación de la aurícula derecha y del tejido de conducción parece ser el doble que la observada para SP (**GERSTHEIMER ET AL, 1988**).

GU ET AL (1983) en humanos, demostraron que la mayor densidad de fibras nerviosas NPY-IR se encontraba en los nodos (fundamentalmente el nodo AV) y en los tejidos alrededor de los vasos coronarios.

Parece ser que NPY no tiene efectos directos sobre la frecuencia cardíaca, aunque múltiples datos apoyan su potente acción moduladora sobre las acciones de otros neurotransmisores. Algunos autores (**POTTER, 1985; WARNER Y LEVY, 1989a,b; 1990a**) observan que, aunque NPY no parece estar localizado en los nervios parasimpáticos del corazón, origina una actividad vagolítica, es decir, una profunda y persistente inhibición de las respuestas a la estimulación vagal en los nodos SA y AV y en el miocardio auricular debido probablemente a la inhibición del neurotransmisor liberado de las terminaciones nerviosas simpáticas y vagales (**LUNDBERG ET AL, 1984; WARNER Y LEVY, 1990a**).

Pero autores como **HASSALL Y BURNSTOCK (1984)** y **FORSGREN (1989c)** observaron que NPY se localiza también en las células ganglionares intrínsecas, con lo

que NPY ejercería efectos tanto en las uniones de las fibras simpáticas como parasimpáticas con las células efectoras y que su acción de inhibición vagal se debe a la acción sobre los terminales nerviosos postgangliónicos colinérgicos (**POTTER, 1985; YANG Y LEVY, 1992**).

Como consecuencia de estas acciones neuromoduladoras, NPY influye en el control neural autonómico de la conducción del nodo SA y AV y es probable que afecte la modulación neural de arritmias auriculares y ventriculares (**CORR, 1992**).

c) VIP

La primera descripción sobre la existencia de fibras nerviosas y cuerpos celulares VIP-IR en el corazón estuvo restringida al nodo sinusal de algunos mamíferos (perros, gatos, cobayas y monos) (**WEIHE Y REINECKE, 1988**) donde se describió una alta densidad de fibras VIP-IR y varicosidades en dicha zona que disminuían abruptamente hacia el miocardio auricular normal. Esto está de acuerdo con los resultados de nuestro estudio y con la mayoría de los autores revisados (**WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984; FORSSMANN ET AL, 1988; RIGEL Y LATHROP, 1990**), donde la densidad de fibras nerviosas VIP-IR vasculares y no vasculares fue mayor en las regiones centrales del nodo SA, disminuyendo hacia el área perinodal, siendo la más baja densidad en el miocardio auricular no especializado.

Según los estudios de diversos autores, las células nodales están densamente innervadas por fibras nerviosas VIP-IR (**WEIHE Y REINECKE, 1981; WEIHE,**

REINECKE Y FORSSMANN, 1984; FORSSMANN ET AL, 1988; FORSGREN, 1989c; RIGEL Y LATHROP, 1990). Además de las células nodales, las pequeñas arterias y los vasos terminales del nodo SA y del AV así como el tejido auricular más adyacente a los nodos (**WEIHE Y REINECKE, 1981; WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984; FORSGREN, 1989c; RIGEL Y LATHROP, 1990**) están inervados por una densa población de nervios inmunorreactivos para VIP. Tales fibras nerviosas se observan sólo ocasionalmente en las paredes arteriales de otras regiones estudiadas (**FORSGREN, 1989c**).

Por el contrario, autores como **LARSSON ET AL (1976)** y **WHARTON ET AL (1981)** en sus estudios en cobayas, no pudieron demostrar la existencia de fibras nerviosas VIP-IR en el corazón.

En cuanto a la distribución de VIP en el nodo AV, tanto **WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN (1984)** como **FORSSMANN ET AL (1988)** apreciaron que la inervación por fibras VIP-IR fue menos densa que la del nodo SA aunque mayor que la de septum interauricular adyacente. Esto está de acuerdo con nuestros resultados. En el haz AV observamos una inervación por fibras varicosas VIP-IR moderadamente densa y con distribución homogénea.

FORSGREN (1989c) en corazón bovino, describió fibras nerviosas VIP-IR predominantemente asociadas con las células nodales SA y AV. Tales fibras, aunque en menor densidad, se distribuyeron también cerca de las células de conducción del haz AV,

las ramas del haz y los tendones falsos. Sin embargo, en las ramas del haz nosotros sólo pudimos identificar fibras nerviosas aisladas VIP-IR entre las fibras musculares.

Todos estos datos podrían explicar el significado funcional del neuropéptido VIP en el tejido de conducción del corazón. Al contrario que otros neuropéptidos, VIP presenta un potente efecto cronotrópico positivo directo. VIP aumenta la frecuencia cardíaca, acorta el tiempo de conducción AV y disminuye las frecuencias auricular y ventricular refractarias regulando los marcapasos supraventriculares (**RIGEL Y LATHROP, 1990**) y su acción es independiente de los receptores colinérgicos y β -adrenérgicos (**FRASE ET AL, 1987; RIGEL Y LATHROP, 1991**).

El análisis de estos datos, ha llevado a algunos autores a deducir que el significado funcional de la concentración de fibras VIP-IR en las regiones de los nodos SA y AV se basa en dos posibilidades:

1) Que VIP posee un efecto regulador en el flujo sanguíneo local en las regiones nodales a través de efectos pre y/o postsinápticos sobre las células de conducción. Nuestras observaciones pudieran apoyar el planteamiento de **FORSGREN (1989c)** en cuanto a que el efecto de VIP sería más pronunciado en los nodos SA y AV que en otras partes del sistema de conducción.

2) Que VIP presenta efectos excitadores directos sobre las células ganglionicas al actuar como un transmisor en las vías aferentes a los ganglios ya que se ha demostrado la presencia de varicosidades VIP-IR relacionadas con los mismos (**RIGEL Y LATHROP, 1991**).

Aunque nuestro trabajo y los de los diversos autores discutidos aquí se realizaron en animales adultos, nos parece interesante destacar los recientes hallazgos de **CHOW ET AL (1993)** en la innervación del sistema de conducción de corazones humanos al nacimiento donde el único péptido encontrado fue NPY (aunque con baja densidad de innervación mostrando sólo nervios perivasculares NPY-IR aislados en el nodo SA). No se encontró inmunorreactividad para SP ni para VIP. También se identificaron nervios DA- β -OHasa, Tirosina hidroxilasa y acetilcolinesterasa positivos en pequeña cantidad. Esto sugiere que aunque exista innervación del sistema de conducción cardíaco humano al nacimiento, el patrón de maduración no ha sido todavía establecido. Esta maduración se producirá posteriormente al nacimiento, especialmente en lo que se refiere a la adquisición de varios neurotransmisores, incluyendo los neuropéptidos (**CHOW ET AL, 1993**).

II.b.- MIOCARDIO

a) SP

Los hallazgos de nuestro estudio en cuanto a la existencia de una densa innervación por fibras nerviosas SP-IR en las aurículas y una densidad menor en los ventrículos, está de acuerdo con estudios previos (**PAPKA ET AL, 1981; WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984; DALSGAARD ET AL, 1986; PAPKA Y URBAN, 1987**), aunque **WHARTON ET AL (1981)**, en cobayas, determinaron por radioinmunoanálisis la concentración de SP en el corazón, observando que en AI y ambos ventrículos la concentración de esta sustancia era semejante. La mayor concentración de SP, se

determinó en AD, septum interventricular y grandes vasos. En este estudio, la distribución de las fibras SP-IR en las paredes de ambos ventrículos era semejante, disponiéndose paralelo a las fibras miocárdicas y en relación con los vasos (arterias y arteriolas) particularmente muy abundantes en endocardio, alrededor de las trabéculas ventriculares y músculos papilares. Se observaron pocas fibras nerviosas en epicardio, en el borde externo del miocardio y alrededor de las ramas de las arterias coronarias.

Aunque estos autores (**WHARTON ET AL, 1981**) determinaron la mayor densidad de fibras SP-IR en endocardio, **DALSGAARD ET AL (1986)** observaron la mayor densidad de inervación tanto en endocardio como en epicardio de aurícula de cobaya. La densidad fue moderada en miocardio y alrededor de los vasos auriculares y septum auricular. En ventrículo, el número de fibras fue pequeño en miocardio y asociado normalmente con los vasos sanguíneos. Se demostró una clara diferencia de inervación de la AD respecto a VI.

Del mismo modo, **URBAN Y PAPKA (1985)** describieron en cobayas un plexo moderadamente denso de fibras SP-IR. Se observaron fibras nerviosas en endocardio, epicardio y miocardio auricular. El patrón fue semejante en los ventrículos, pero el número de fibras fue menos numeroso.

Por el contrario, **WEIHE Y REINECKE (1983)** describen fibras SP-IR distribuidas principalmente en pericardio y epicardio sin inervar el músculo y **PAPKA Y URBAN (1987)** en rata, observaron muy pocas fibras SP-IR en epicardio y miocardio

auricular y ventricular. Estos últimos autores, comparando la innervación SP-IR en cobaya y rata objetivaron que en la rata existe 40 veces menos SP que en el corazón de cobaya.

Nosotros objetivamos una mayor innervación de aurículas respecto a ventrículos. En las aurículas, la mayor densidad de fibras SP-IR se identificó en AD con fibras largas y finas en endocardio y también, en menor cantidad, en epicardio y miocardio. En la AI, la innervación fue moderada pero mayor que en ventrículos. En ambos ventrículos, la mayor innervación por fibras SP-IR se observó en el endocardio fundamentalmente a nivel de la inserción de las valvas y en la zona próxima a ellas. En miocardio, no observamos apenas fibras SP-IR; en epicardio, las fibras fueron escasas aunque existió una densa innervación SP-IR cerca de las arterias coronarias epicárdicas con largas y finas fibras paralelas a las células musculares.

RECHARDT ET AL (1986) estudiaron la innervación peptidérgica del miocardio auricular humano, encontrando fibras nerviosas SP-IR entre las fibras musculares cardíacas y próximas a los vasos sanguíneos. El hallazgo de una íntima asociación entre los nervios SP-IR y las células miocárdicas hace pensar que existen receptores miocárdicos para SP que regulan la excitabilidad y la conducción del impulso en el músculo auricular. Además, la existencia de una mayor innervación en el endocardio de las paredes del corazón apoya el hecho de que SP parece actuar mediante la liberación desde el endocardio de un factor relajante derivado del endotelio (EDRF) y que la extirpación del endocardio en preparaciones de músculo cardíaco aislado condiciona que SP no actúe sobre el mismo (**MILNER ET AL, 1989**).

Estudios recientes demuestran que SP ejerce una acción indirecta modulando el tono cardíaco neural. Sus efectos pueden ser positivos o negativos sobre la contractilidad, dependiendo de la actividad vagal o simpática que predomine (con tono vagal elevado, SP origina aumento de la contractilidad y con tono simpático elevado la disminuye) (SMITH, PRIOLA Y BLOMQUIST, 1992).

b) NPY

Debido a la alta inmunorreactividad encontrada para NPY en el corazón, se considera que esta sustancia es uno de los principales neuropéptidos cardíacos (GU ET AL, 1984; PURJERANTA ET AL, 1986; PRADOS FRUTOS ET AL, 1992; GORDON ET AL, 1993; PRADOS FRUTOS, MARTIN PEREZ Y PUERTA FONOLLA, 1993). Los hallazgos morfológicos de la distribución de fibras NPY-IR en las paredes cardíacas difieren según los autores. Mientras que algunos describen una mayor inervación de aurículas respecto a ventrículos (UDDMAN ET AL (1985) y DALSGAARD ET AL (1986) en cobayas; FORSGREN (1989c) en corazón bovino; CORR ET AL (1990) en rata; LUNDBERG ET AL (1983) en cobaya, gato, cerdo y hombre), otros autores como ALLEN ET AL (1985a) en ratas observaron una densidad semejante de fibras nerviosas NPY-IR en aurículas, septum interauricular y ambos ventrículos. Nosotros hallamos mayor inervación NPY-IR en aurículas respecto a ventrículos, aunque la densidad de inervación en estos últimos también fue abundante.

Del mismo modo, GORDON ET AL (1993) observaron que NPY representa el 45% de toda la inervación del miocardio de AD y mostrando un gradiente de densidad

decreciente de inervación de aurícula a ventrículo. También existe un gradiente entre los lados derecho e izquierdo del corazón, con mayor densidad de nervios NPY-IR en AD y VD comparado con AI y VI, respectivamente.

UDDMAN ET AL (1985), en cobayas, observaron fibras NPY-IR en todas las capas del corazón predominando en endocardio y epicardio, mientras que, por el contrario, **GU ET AL (1984)** han descrito una mayor densidad de inervación del miocardio respecto al endocardio y epicardio. En nuestro estudio, observamos una alta densidad de inervación en miocardio aunque también fue alta en endocardio (fundamentalmente a nivel de la inserción de las valvas) y en epicardio (alrededor de las arterias coronarias). En aurículas, la densidad de inervación mayor se observó en la región subepicárdica. Por el contrario, en ventrículos, tanto subepicardio como subendocardio, estuvieron densamente inervados.

Estudios en rata (**GU ET AL, 1984; ALLEN ET AL, 1985a; CORR ET AL, 1990**) describen nervios NPY-IR íntimamente relacionados con las células musculares cardíacas. Las fibras nerviosas NPY-IR se identificaron en todas las áreas del corazón en los plexos perivasculares y fascículos intramusculares de distinto tamaño (**LUNDBERG ET AL, 1983; ALLEN ET AL, 1985a**).

También en humanos se han demostrado numerosas fibras nerviosas NPY-IR en la orejuela de AD dispuestas a modo de redes irregulares de fibras en el miocardio y de

plexos paralelos en endocardio (PURJERANTA ET AL, 1986; WHARTON ET AL, 1988).

En cuanto al significado funcional de las fibras nerviosas relacionadas con los miocitos auriculares y ventriculares que contienen NPY, parece ser que este neuropéptido presenta acciones inotrópicas negativas (MAENO, KIYAMA Y TOHYAMA, 1993), aunque no está del todo establecido cuál es el mecanismo y si existen receptores para NPY en los miocardiocitos (FRANCO-CERECEDA, LUNDBERG Y DAHLOF, 1985; ALLEN ET AL, 1986). Aunque se ha demostrado que NPY inhibe la contractilidad cardíaca in vivo en el corazón de la rata (BALASUBRAMANIAM ET AL, 1988), MICHEL ET AL (1989) observaron que NPY no disminuye directamente la contractilidad cardíaca en humanos. Sus efectos inhibitorios podrían ser secundarios a vasoconstricción coronaria, inhibición presináptica de la liberación de catecolaminas y/o a una actividad barorrefleja.

c) VIP

En cuanto a la inervación por VIP de las paredes cardíacas, estamos de acuerdo con los diversos estudios consultados, en los que las fibras nerviosas VIP-IR se localizan predominantemente a nivel de las aurículas, siendo en los ventrículos muy escasas (WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984; FORSSMANN ET AL, 1988) o inexistentes (DELLA ET AL, 1983; WEIHE Y REINECKE, 1983). La mayoría de la inervación VIP-érgica ventricular se observa alrededor de las ramas coronarias (FORSSMANN ET AL, 1988). Sin embargo, GORDON ET AL (1993) observaron que

las fibras VIP-IR representaban menos del 2% de la inervación cardíaca sin existir un gradiente de densidad de inervación auriculo-ventricular, lo cual no coincide con nuestros resultados.

La mayor densidad de inervación parece localizarse a nivel subepicárdico donde las fibras VIP-IR se distribuyen alrededor de los vasos coronarios. Son más abundantes en el epicardio cercano al nodo SA que en el epicardio de las restantes regiones auriculares (WEIHE Y REINECKE, 1981; WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984).

En nuestro estudio, encontramos fibras en todas las capas de las paredes auriculares, con distribución heterogénea, observándose concentraciones focales de fibras nerviosas y cuerpos celulares VIP-IR en algunas zonas, siendo en otras prácticamente inexistentes. En los ventrículos, sólo identificamos fibras VIP-IR subepicárdicas en pequeña densidad en la zona próxima a las arterias coronarias.

En el subendocardio, las fibras VIP-IR son infrecuentes, excepto en la zona de inserción de las valvas como veremos después. Nosotros, en el endocardio de aurículas observamos fibras aisladas VIP-IR que en alguna ocasión se disponían en haces de varias fibras varicosas, lo cual está de acuerdo con los estudios previos realizados por DELLA ET AL (1983). En la zona de inserción de las valvas mitral y tricuspídea, la inervación fue moderadamente densa, más densa en mitral que tricúspide.

WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN (1984) compararon la distribución de SP y VIP en las paredes cardíacas, objetivando que en el endocardio de aurículas, ventrículos y tejido valvular AV, las fibras nerviosas SP-IR fueron más frecuentes que las VIP-IR. Las fibras nerviosas no asociadas con estructuras vasculares contenían numerosas fibras SP-IR pero algunas VIP-IR. Las fibras VIP-IR se localizaron preferentemente en el epicardio de la aurícula y en el epicardio cercano a los vasos coronarios mientras que las fibras SP-IR se distribuyeron por todo el epicardio auricular y ventricular. En el pericardio, se encontraron frecuentes fibras nerviosas SP-IR, mientras que las fibras VIP-IR se encontraron sólo ocasionalmente.

En el septum interauricular, se ha observado un plexo moderadamente denso de fibras varicosas VIP-IR aisladas o en pequeños haces (**DELLA ET AL, 1983**). Nosotros también observamos una inervación moderadamente densa VIP-IR pero, a diferencia de estos autores, las fibras fueron largas y ramificadas pudiéndose, en ocasiones, identificar estructuras semejantes a cuerpos celulares nerviosos. Tanto en el septum, como en la crista terminalis y alrededor del ostium del seno coronario se ha descrito la mayor densidad de inervación respecto al tejido auricular adyacente (**WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984**).

Esta distribución de VIP en las paredes cardíacas es semejante a la distribución de ACh (**WILLIAMS ET AL, 1989**). Tanto la cuantificación de colina acetiltransferasa (ChAT) como los niveles de ACh en el corazón de la rata sugieren una distribución no uniforme de los nervios colinérgicos en este órgano. Los niveles más elevados de ambas

se localizan en las aurículas (AD, nodo SA, AI y septum interauricular) donde se encuentran las células ganglionares intracardíacas y los terminales parasimpáticos pre y postgangliónicos. Niveles mucho menores existen en ambos ventrículos donde la concentración de ACh es aproximadamente el 10% de la encontrada en las regiones auriculares (WILLIAMS ET AL, 1989).

El significado funcional de VIP sobre los miocardiocitos auriculares y ventriculares se explica por el efecto inotrópico positivo observado tanto tras administración intravenosa sistémica (FRASE ET AL, 1987) como tras administración intraarterial en AD aislada de perros (KARASAWA ET AL, 1990). Se ha demostrado que la contractilidad máxima auricular originada por VIP es mayor que la ventricular indicando que la densidad de receptores para VIP en los nervios que inervan la AD es mayor que en VI (KARASAWA ET AL, 1990).

INERVACION VALVULAR

Estudios realizados en diversos mamíferos han demostrado la existencia de células miocárdicas especializadas formando un anillo en los dos tercios basales de las válvulas MITRAL y TRICUSPIDE que se asocian con fibras nerviosas eferentes y sensitivas. Tanto el anillo de la válvula Mitral como el de la Tricúspide muestran una densa inervación por fibras que contienen catecolaminas y acetilcolina (ANDERSON, 1972). En el corazón de la rata, WILLIAMS ET AL (1989), describieron la existencia de un

denso plexo nervioso acetilcolinesterasa-positivo en la base de las válvulas Mitral y Tricúspide y otro plexo a nivel distal sin alcanzar el borde libre de las valvas. La innervación de la válvula Tricúspide, aunque con similar distribución, fue menos densa que la de la Mitral.

Estudios fisiológicos en el perro y conejo han demostrado la capacidad de contractilidad y automaticidad de este músculo valvular. Durante la estimulación eléctrica de las cúspides de la válvula Mitral del corazón del perro, Nor y ACh actúan sobre la cantidad de tensión desarrollada, aumentándola y disminuyéndola, respectivamente (**WILLIAMS ET AL, 1989**). Además, se ha observado que el músculo de las válvulas AV es capaz de generar impulsos espontáneos, con lo que el Sistema Nervioso autónomo intrínseco puede desempeñar un papel en el desencadenamiento de arritmias y extrasístoles prematuros (**WILLIAMS ET AL, 1989**).

Estas observaciones sugieren que las válvulas AV no son estructuras puramente mecánicas sino que pueden participar en sus mecanismos de apertura y cierre y por otra parte, monitorizar el flujo sanguíneo a través de diferentes regiones de la cúspide valvular, pudiendo actuar funcionalmente como mecanorreceptores (**WILLIAMS ET AL, 1989**).

En nuestro estudio, y a la vista de la presunta importancia funcional de la presencia de fibras nerviosas y células musculares en la zona de inserción AV, hemos demostrado fibras nerviosas SP-IR a nivel de los orificios valvulares Mitral y Tricúspide

dispuestas entre las fibras musculares del anillo valvular. No observamos fibras en el borde libre de las valvas. Igualmente, **WHARTON ET AL (1981)** observaron fibras SP-IR en en el anillo valvular y cerca del borde libre de las cúspides valvulares. A diferencia de nosotros, estos autores identificaron extensas redes de fibras nerviosas SP-IR en el miocardio alrededor de las zonas de inserción de las válvulas Aórtica y Pulmonar.

DELLA ET AL (1983) describieron la existencia de un plexo moderadamente laxo de fibras varicosas VIP-IR en la zona de inserción de las válvulas AV, paralelas al anillo AV y extendiéndose hacia el centro de las valvas sin alcanzar su borde libre, mientras que **WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN (1984)** describieron muy pocas fibras en las válvulas AV.

UDDMAN ET AL (1985) en cobayas, describen muy pocas fibras NPY-IR en las válvulas mientras que para **DALSGAARD ET AL (1986)**, también en cobayas, la inervación del músculo subvalvular es muy densa, mayor incluso que en aurículas y alrededor de los vasos, al igual que para **GU ET AL (1984)** que encuentran numerosas fibras nerviosas en las valvas, disminuyendo su densidad hacia el borde libre de las mismas.

Nosotros encontramos que la mayor inervación peptidérgica de las válvulas está representada por fibras largas NPY-IR que no alcanzan el extremo libre de las valvas. También es abundante por SP mientras que VIP sólo está presente en fibras varicosas aisladas VIP-IR.

I.c.- VASOS CORONARIOS

a) SP

En este estudio, hemos demostrado la existencia de finos nervios vasculares SP-IR localizados en el límite entre la adventicia y la media de las arterias coronarias de la rata. Los troncos nerviosos de los que se originan estos nervios se localizan en la adventicia. La mayor parte de las fibras eran finas y con forma de tirabuzón, aunque también pudo observarse alguna fibra varicosa.

REINECKE, WEIHE Y FORSSMANN (1980) en cobayas, encontraron que todo el sistema arterial coronario estaba inervado por fibras nerviosas SP-IR: desde el origen de las arterias coronarias derecha e izquierda a las arteriolas precapilares y metaarteriolas. La densidad de fibras nerviosas y varicosidades SP-IR parecía decrecer a medida que disminuye el calibre de las arterias no observando estructuras SP-IR en el tejido precapilar. Las vénulas musculares y venas coronarias mostraron una densidad de inervación menos densa por SP que las arterias de diámetro mayor.

También en cobayas, otros autores han demostrado la existencia de un escaso a moderado número de fibras nerviosas SP-IR alrededor de las arterias coronarias normalmente localizadas en la adventicia (**FURNESS ET AL, 1982; PAPKA Y URBAN, 1987**).

En lo que todos los estudios parecen estar de acuerdo es en que las fibras nerviosas SP-IR están principalmente localizadas en las ramas más grandes de la vascularización coronaria respecto al lecho vascular coronario terminal. Los capilares no están inervados observándose sólo en ocasiones alguna fibra aislada (**REINECKE, WEIHE Y FORSSMANN, 1980; FURNESS ET AL, 1984; WEIHE ET AL, 1981; WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984; GERSTHEIMER ET AL, 1988**).

Sin embargo, en un reciente trabajo de **GULBENKIAN ET AL (1993)** en arterias coronarias humanas, las fibras nerviosas SP-IR fueron escasas en las regiones proximales de las arterias coronarias (diámetro interno mayor de 0,8 mm) y aumentaron en número distalmente (diámetro interno menor de 0,8 mm).

Previamente, también **WEIHE ET AL (1981)**, aunque en estudios limitados a biopsias endomiocárdicas de pacientes con cardiomiopatías congestivas o hipertróficas, no evidenciaron la existencia de fibras en las grandes ramas de las arterias coronarias. Observaron fibras nerviosas y varicosidades restringidas al plexo perivascular y en íntimo contacto con arteriolas, capilares y vénulas. No se observaron fibras que invadasen células miocárdicas o no relacionadas con microvasos.

Nuestros estudios concuerdan con **GERSTHEIMER ET AL (1988)** que afirman que la mayoría de SP-IR se localiza alrededor de las arterias epicárdicas donde los nervios SP-IR no sólo se distribuyen alrededor de los vasos sino también en el tejido conectivo subepicárdico.

WEIHE ET AL (1983, 1984) en el gato y perro, observaron que las fibras nerviosas SP-IR se disponen fundamentalmente en localización paravascular mientras que VIP lo hace en los plexos peri y paravascular. Nosotros no observamos claramente esta diferencia porque la rata tiene intersticios perivascuales estrechos (en el perro y gato son más amplios).

SP es un potente vasodilatador de las arterias coronarias y las fibras nerviosas SP-IR que existen alrededor de las mismas pueden desempeñar un importante papel en la regulación del tono vascular coronario epicárdico (**LOSAY ET AL, 1977; CORR, 1992; GULBENKIAN ET AL, 1993**). Actuando a través de receptores de neuroquininas localizados en las células endoteliales, induce una relajación endotelio-dependiente del músculo liso vascular a través de la liberación de una sustancia vasodilatadora denominada Factor Relajante derivado del Endotelio (EDRF) (**OKUMURA ET AL, 1992; GULBENKIAN ET AL, 1993**). Está generalmente aceptado que SP, tras liberarse de los nervios perivascuales, puede difundir a través de la capa media y activar receptores en las células endoteliales, que conducen a una liberación de agentes relajantes tales como EDRF u óxido nítrico. Alternativamente, se ha sugerido que SP puede liberarse de las células endoteliales y actuar en sus receptores para originar la liberación de EDRF o prostaglandinas (**MILNER ET AL, 1989**). Las células endoteliales (5 a 10%) de las arterias mesentérica y femoral de la rata contienen SP (**LOESCH Y BURNSTOCK, 1988**). Nosotros hemos demostrado la existencia de SP en las células endoteliales de arterias no visto hasta ahora. Así, mediante la liberación autocrina de SP

sintetizada y liberada localmente por las células endoteliales pueden activar receptores endoteliales y representar un mecanismo regulador local del tono vascular.

Por otro lado, ya que las varicosidades SP-IR, que probablemente son terminaciones nerviosas tipo receptor, se han descrito no sólo en la adventicia del arco aórtico (**HELKE, O'DONOHUE Y JACOBOWITZ, 1980; REINECKE, WEIHE Y FORSSMANN, 1980**) sino también en relación con los vasos sanguíneos (**REINECKE, WEIHE Y FORSSMANN, 1980; WEIHE ET AL, 1981**) parece razonable pensar que SP tiene una función baro y quimiorreceptora sobre los vasos coronarios, incluyendo los segmentos que inervan el nodo sinusal con lo que eleva el rendimiento cardíaco y aumenta el flujo sanguíneo coronario.

Como ya se comentó en la introducción, los nervios cardíacos simpáticos son portadores de fibras aferentes que son las encargadas de conducir los estímulos dolorosos. Ya que la denervación del corazón del simpático, extirpando los cinco ganglios torácicos superiores y el ganglio cervical inferior del tronco simpático en la cirugía del alivio del dolor de la angina de pecho intratable, puede seguirse de persistencia de algo de dolor (**ANDERSON Y BECKER, 1981; ORTS LLORCA, 1985**), se cree que algunas fibras aferentes dolorosas pueden hallarse en el vago y siguen su ruta. Estas terminaciones aferentes terminan en el subendocardio auricular y ventricular y en la valva pulmonar de los mamíferos incluido el hombre (**TALMAN Y KELKAR, 1993**). Pero además, ya que SP se relaciona con las fibras sensitivas encargadas de la transmisión de los estímulos dolorosos, podríamos deducir que también SP participa en el dolor coronario. Así, SP

se eleva en el líquido pericárdico de pacientes con angina de pecho respecto a los controles sanos (**TALMAN Y KELKAR, 1993**).

b) NPY

En cuanto a la inervación vascular cardíaca por fibras NPY-IR, nosotros encontramos una densa inervación por fibras nerviosas NPY-IR en las arterias coronarias superior a la de SP y mucho mayor que la de VIP. Las fibras nerviosas se disponían alrededor de las arterias coronarias en la región epicárdica con troncos nerviosos de los que se originan finas fibras hacia la adventicia y la media.

También **UDDMAN ET AL (1985)** en cobayas y **GORDON ET AL (1993)** en corazón bovino, han observado que los vasos coronarios reciben una densa inervación por NPY. Del mismo modo, **GERSTHEIMER ET AL (1988)** en cobayas, mediante estudios morfométricos, encontraron que la mayor densidad de inervación por fibras NPY-IR se localizaba alrededor de los vasos. Los nervios inmunorreactivos para NPY se localizaron alrededor o en la vecindad de arteriolas y vasos terminales y entre los miocardiocitos. Los nervios NPY-IR encontrados alrededor de las arterias formaron una densa red de la cual pequeñas fibras alcanzaban la media. La concentración de NPY en las arterias fue cinco veces mayor que la de SP.

En rata y ratón, **GU ET AL (1984)** describieron fibras nerviosas NPY-IR rodeando los vasos coronarios, particularmente las ramas arteriales medianas y pequeñas. También en corazón bovino, **FORSGREN (1989a,c)** describió plexos de fibras nerviosas

NPY-IR en las arterias y arteriolas de todas las regiones cardíacas examinadas en la unión media-adventicia o justo fuera de esta unión.

GULBENKIAN ET AL (1993) en arterias coronarias humanas observaron una densa inervación por fibras nerviosas NPY-IR tanto a nivel proximal como distal, incluso mayor en vasos de calibre menor (diámetro interno menor de 0,8 mm). El número relativo y distribución de los nervios NPY-IR fue semejante a la de los nervios tirosina hidroxilasa-IR, enzima que sintetiza catecolaminas.

La observación morfológica de plexos periarteriales de fibras nerviosas NPY-IR relacionadas con los vasos coronarios es compatible con el conocido efecto fisiológico regulador de este neuropéptido sobre el flujo cardíaco del corazón (**ALLEN ET AL, 1983, 1986**). Pero, aunque inicialmente, diversos autores observaron que NPY produce vasoconstricción endotelio-independiente de las arterias coronarias en distintas especies (**ALLEN ET AL, 1983; EDVINSSON ET AL, 1987; FRANCO-CERECEDA Y LUNDBERG, 1987; PERNOW Y LUNDBERG, 1988; RIGEL Y LATHROP, 1990; WARNER Y LEVY, 1990a; GULBENKIAN ET AL, 1992; 1993; CIARLEGLIO, BEINFELD Y WESTFALL, 1993**), estudios más recientes han demostrado que NPY no tiene efecto en las arterias epicárdicas grandes y sólo un débil efecto vasoconstrictor en las arterias coronarias pequeñas (**GULBENKIAN ET AL, 1993**) originando constricción de los vasos de resistencia intramiocárdicos más que de las arterias epicárdicas.

Por tanto, aunque no está del todo determinado el significado funcional de NPY en las arterias coronarias epicárdicas, es probable que participe en la modulación de las acciones relajantes de otros agentes vasoactivos, ayudando a mantener el tono vascular de las arterias coronarias.

c) **VIP**

WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN (1984) describieron un número moderado de fibras nerviosas VIP-IR en los segmentos iniciales de ambas arterias coronarias y muy escasas en algunas venas coronarias dentro del epicardio en el límite media-adventicia. La inervación VIP-IR parecía estar restringida a algunas regiones circumcoronarias en la vecindad de los surcos interventricular y coronario, en las partes distales de las arterias coronarias y en las ramas ventriculares intra y extramurales. La densidad de fibras nerviosas VIP-IR parece aumentar de proximal a distal: el número de fibras nerviosas VIP-IR fue bajo en las grandes ramas de las arterias coronarias, moderado en los vasos pequeños y aumentó considerablemente en los vasos más pequeños y en la vasculatura terminal: arteriolas, metaarteriolas y capilares (en éstas últimas existen fibras en contacto con el endotelio) y vénulas (muchas fibras VIP-IR se demostraron a lo largo de la pared endotelial).

Estos datos están de acuerdo con **DELLA ET AL (1983)** en corazón de cobaya donde varias arterias coronarias de pequeño tamaño (de más de 200 micras de diámetro) se rodearon de un plexo moderadamente denso de fibras varicosas únicas. Sin embargo, estos autores no observaron nervios reactivos a VIP en las venas coronarias.

Por el contrario, **GULBENKIAN ET AL (1993)** en arterias coronarias epicárdicas humanas, sólo detectaron unas pocas fibras VIP-IR aisladas tanto a nivel proximal (arterias con diámetro interno mayor de 0,8 mm) como distal (diámetro interno menor de 0,8 mm). Nosotros, al igual que estos autores, encontramos fibras nerviosas VIP-IR en la adventicia de las arterias coronarias epicárdicas pero con una distribución más limitada si lo comparamos con los otros péptidos estudiados.

También **FORSSMANN ET AL (1988)** observaron fibras nerviosas VIP-IR sobre todo en los plexos perivasculares (aunque también en número moderado en los paravasculares) de las porciones extramurales (ramas principales de las arterias coronarias), en los vasos intramurales, sólo en las de las aurículas aunque la densidad de inervación VIP-IR fue mayor en las pequeñas arterias y arteriolas que en las grandes. Raramente en la adventicia de las venas coronarias.

Los resultados de diversos estudios han llegado a la conclusión de que VIP induce una potente respuesta vasodilatadora en diversos lechos vasculares y en vasos aislados (**EKLUND ET AL, 1979; HEISTAD ET AL, 1980; LUNDBERG, 1981; DELLA ET AL, 1983**). En el corazón, es un potente vasodilatador coronario (**BRUM ET AL, 1986; HOOVER, 1989; GULBENKIAN ET AL, 1993**). Su efecto vasodilatador parece ser directo, a través de receptores específicos para VIP existentes en las membranas de las arterias coronarias (**HUANG Y ROORSTAD, 1987**) e independiente de la presencia de endotelio intacto (**BENY, BRUNET Y HUGGEL, 1986**). Sin embargo, en otros casos, como en la aorta de la rata, en la arteria pulmonar bovina y en la arteria esplénica

humana, VIP origina vasodilatación por un mecanismo endotelio-dependiente (SATA ET AL, 1988).

Además, en el corazón, si VIP interacciona con el músculo liso arterial independientemente del endotelio intacto, las alteraciones de la íntima en los procesos patológicos no alterarían la vasodilatación producida por este péptido. Esto es de gran importancia porque una deficiencia endotelial puede resultar en una alteración del tono muscular coronario en las enfermedades coronarias. Además, en estados patológicos como el shock hemorrágico y endotóxico en perros, se ha demostrado que VIP se libera a la circulación. Este péptido puede servir para aumentar el flujo sanguíneo a órganos vitales como el corazón, cerebro y tracto digestivo (SAID, 1987).

I.d.- GRANDES VASOS

Nosotros observamos la existencia de fibras nerviosas SP-IR en la adventicia de las arterias a modo de largas fibras con disposición paravascular. También FALCK ET AL (1962) y WHARTON ET AL (1981) describieron una extensa red de gruesas fibras SP-IR intensamente fluorescentes alrededor de los vasos pulmonares y aorta.

Además también finas fibras varicosas SP-IR fueron observadas en la íntima de la pared de los vasos. Esto no ha sido observado por otros autores previamente.

En nuestros resultados, hemos observado una inervación moderadamente densa por fibras NPY-IR fundamentalmente a nivel de la adventicia de la aorta proximal y tronco pulmonar de forma varicosa y en ocasiones longitudinal (Figs. 90 a 95). Esto está de acuerdo con los estudios realizados por **ALLEN ET AL (1985a)** en ratas, que observaron pocas fibras nerviosas NPY-IR en la pared de distintas partes de la aorta (cayado aórtico aorta torácica y porción anterior de la aorta abdominal).

Por el contrario, **UDDMAN ET AL (1985)** en cobayas, describieron una densa inervación por fibras NPY-IR en aorta torácica, grandes arterias pulmonares, arteria carótida común, carótida externa y polígono de Willis. Observaron estos autores que la densidad de inervación por fibras NPY-IR disminuye a medida que la aorta desciende en la cavidad abdominal. Sin embargo, a medida que el diámetro de las arterias musculares disminuye, la densidad de NPY-inmunorreactividad aumenta. Esta distribución es semejante a la inervación adrenérgica de los vasos sanguíneos (**UDDMAN ET AL, 1985; ALLEN ET AL, 1985a**).

En nuestro estudio, la densidad de fibras nerviosas VIP-IR en los grandes vasos que se originan del corazón fue mucho menor que la de SP y NPY. No obstante, observamos fibras VIP-IR muy finas y varicosas en la unión media-adventicia.

WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN (1984) también demostraron la existencia en distintos mamíferos, de fibras nerviosas VIP-IR en pequeña densidad en la unión media-adventicia de la aorta ascendente, tronco pulmonar y venas pulmonares

siendo muy raras en las venas cavas. Algunas veces alcanzaban las células musculares lisas más externas de la media, y además inervaron algunos vasos de los vasa vasorum.

También nuestros resultados concuerdan con **DELLA ET AL (1983)** que describieron una inervación escasa por fibras VIP-IR en el corazón y grandes vasos (aorta ascendente, tronco pulmonar y arterias principales pulmonares) en el cobaya. En todas las demás arterias (aorta torácica, ilíacas, femoral, poplítea, carótida común y subclavia) la inervación fue muy escasa. Esto contrasta con la inervación por SP, moderadamente densa en el corazón y densa en las grandes arterias y vena cava cerca del corazón (**REINECKE, WEIHE Y FORSSMANN, 1980; PAPKA ET AL, 1981; WHARTON ET AL, 1981; FURNESS ET AL, 1982**). Además la densidad de inervación por fibras VIP-IR es generalmente mayor en lechos vasculares regionales (mesentérico, reproductor y cerebral) que en los grandes vasos (excepto en la aorta abdominal donde hallaron fibras VIP-IR más abundantes a modo de haces paralelos con interconexiones). Por el contrario, la densidad de fibras SP-IR (con excepción de los lechos espláncnicos) disminuye hacia la periferia (**DELLA ET AL, 1983**).

II) EFECTOS DERIVADOS DEL TRATAMIENTO CON 6-HIDROXIDOPAMINA (6-OH-DA)

II.a.- EFICACIA DE LA SIMPATECTOMIA QUIMICA CON 6-OH-DA

PORTER, TOTARO Y STONE (1963) fueron los primeros en demostrar los efectos biológicos de 6-OH-DA en cuanto a su capacidad de producir deplección de Nor de los corazones de ratones y perros, observando que la duración de la acción de esta sustancia era mayor que la de otros agentes farmacológicos conocidos hasta entonces.

Posteriormente, **THOENEN Y TRANZER (1968)** demostraron que el tratamiento sistémico con 6-OH-DA originaba alteraciones morfológicas selectivas en las terminaciones nerviosas adrenérgicas mientras que las células de Schwann, las células musculares lisas y las terminaciones nerviosas colinérgicas no mostraban alteración. A los 3-4 meses del tratamiento con 6-OH-DA, detectaron regeneración de las terminaciones nerviosas adrenérgicas en el corazón y otros órganos.

Estos y otros estudios posteriores han probado la validez de 6-OH-DA para producir simpatectomía siendo, por tanto, uno de los agentes más empleados en estudios experimentales (**KOSTREWA Y JACOBOWITZ, 1974; ALLEN ET AL, 1985a**).

Además, se ha demostrado que la simpatectomía química con 6-OH-DA es similar a la obtenida con denervación quirúrgica o inmunosimpatectomía (**THOENEN Y TRANZER, 1968; MACCARRONE Y JARROT, 1987**). La principal ventaja de la 6-OH-DA respecto a los otros métodos de simpatectomía es su gran simplicidad y su efecto generalizado. No obstante, tras tratamiento con 6-OH-DA existen diferencias entre órganos. **THOENEN Y TRANZER (1968)** observaron que el contenido de Nor tras tratamiento con esta sustancia se redujo en el corazón y bazo a 7,6 y 5,1% respectivamente, mientras que en conducto deferente sólo se redujo al 18,8%. También observaron diferencias entre especies y según las vías de administración y dosis de tratamiento.

En general, parece que los terminales adrenérgicos en el corazón del ratón son más susceptibles a la lesión por 6-OH-DA que los del corazón de la rata. Dosis similares de 6-OH-DA (20 mg/kg intravenosa) parecen disminuir el contenido de Nor en el corazón del ratón a una mayor extensión que en el corazón de la rata en todos los períodos de tiempo estudiados (**KOSTRZEWA Y JACOBOWITZ, 1974**).

En cuanto a la vía de administración, empleamos la intraperitoneal, porque además de su fácil realización, se ha observado que tanto la administración de 6-OH-DA por vía intraperitoneal como intravenosa, parecen ser igualmente efectivas en producir simpatectomía. En el corazón de la rata, una dosis de 20 mg/kg intravenosa parece ser casi equivalente a 30 mg/kg intraperitoneal cuando se mide la concentración de Nor tras 48 horas del tratamiento (**KOSTRZEWA Y JACOBOWITZ, 1974**).

Respecto a las dosis de tratamiento, diferentes esquemas se han empleado, observándose los resultados de la simpatectomía a diferentes intervalos de tiempo entre la última dosis de 6-OH-DA y el sacrificio de los animales. En el corazón, se ha visto que una dosis moderada de 6-OH-DA produce alteraciones en las neuronas cardíacas simpáticas que tardan en recuperar su patrón de inervación normal 3-4 meses **(KOSTRZEWA Y JACOBOWITZ, 1974)**.

En el corazón, la neurotransmisión simpática está mediada por dos mensajeros: Nor y NPY que coexisten en los terminales simpáticos que inervan los vasos coronarios, músculo cardíaco y tejido nodal **(LUNDBERG ET AL, 1982; 1983; 1985b; EKBLAD ET AL, 1984; GU ET AL, 1984; ALLEN ET AL, 1985a; STERNINI Y BRECHA, 1985; UDDMAN ET AL, 1985; DALSGAARD ET AL, 1986)**. Los datos que ponen de manifiesto la coexistencia de NPY y Nor en los nervios cardíacos simpáticos son: a) la simpatectomía reduce tanto los niveles de NPY como de Nor, b) NPY y Nor se liberan juntos tras estimulación directa de las neuronas cardíacas simpáticas, y c) NPY se encuentra, en la mayor parte de las fibras nerviosas que también son inmunorreactivas para tirosina hidroxilasa y DA- β -OHlase.

Considerando estos datos, y teniendo en cuenta que el tratamiento con 6-OH-DA origina degeneración de los terminales nerviosos de las neuronas adrenérgicas, en nuestro estudio observamos que la deplección más completa de NPY (y con ello, la simpatectomía más completa), se consiguió cuando los animales se trataron con una dosis total de 150 mg/kg. Una semana después de la última dosis de 6-OH-DA, sólo se

observaron fibras nerviosas aisladas NPY-IR en algunas preparaciones de la aurícula y en torno a los vasos coronarios. Sin embargo, a dosis más bajas de tratamiento (75 mg/kg) persiste una mayor densidad de fibras nerviosas NPY-IR que con dosis de 150 y 500 mg/kg. La densidad de fibras nerviosas NPY-IR tras administración de estos dos protocolos de tratamiento fue semejante.

Consideramos, por tanto, válido nuestro tratamiento con 150 mg/kg de 6-OH-DA en ratas por dos razones. En primer lugar, por la evidencia de simpatectomía realizada por diversos autores cuyos trabajos han sido realizados principalmente en ratas y en segundo lugar, indirectamente por la deplección semejante de NPY a dosis de 150 y 500 y menor a dosis de 75 mg/kg.

Además, el tratamiento con 6-OH-DA de ratas adultas reveló que la alta densidad de fibras nerviosas NPY-IR observada en los corazones de los animales sin tratar, mostró una reducción significativa tras tratamiento con 6-OH-DA, dato que se corresponde con la evidencia electrofisiológica y farmacológica de una denervación autonómica funcional (GORDON ET AL, 1993).

III.b.- EFECTOS DE LA SIMPATECTOMIA CON 6-OH-DA SOBRE LA DISTRIBUCION DE NPY EN EL CORAZON Y GRANDES VASOS

Nuestros estudios están de acuerdo con los resultados de la simpatectomía química y quirúrgica en otros animales experimentales donde se han descrito reducciones

significativas de los niveles de NPY y Nor (LUNDBERG ET AL, 1982; 1985b; ALLEN ET AL, 1985a; MORRIS ET AL, 1986; DALSGAARD ET AL, 1986; MACCARRONE Y JARROT, 1987; GORDON ET AL, 1993).

Así, en un reciente trabajo, GORDON ET AL (1993) han observado una íntima correlación entre los nervios tirosina hidroxilasa-IR y los nervios NPY-IR en respuesta a la denervación quirúrgica. En los grupos control, NPY representó el 45% de la inervación total del miocardio de la AD y tirosina hidroxilasa el 20%. Tras denervación quirúrgica (crioablación), los nervios NPY-IR y tirosina hidroxilasa-IR en la AD representaron sólo el 1,01% y 0,92% respectivamente de la inervación miocárdica intacta.

Nosotros observamos que con dosis de 150 mg/kg, la densidad de fibras nerviosas NPY-IR se redujo considerablemente en todas las zonas estudiadas (sistema de conducción, paredes cardíacas, vasos coronarios y grandes vasos). No obstante, encontramos diferencias entre las distintas regiones. Así, en ventrículos y en sistema de conducción la deplección fue mayor, no identificándose NPY-IR en la mayor parte de las preparaciones. Por el contrario, en aurículas y septum interauricular, tras el mismo esquema de tratamiento, se observó una considerable densidad de fibras nerviosas NPY-IR (Figs. 109 a 112).

Como ya hemos dicho, el tratamiento con 6-OH-DA origina degeneración de los terminales nerviosos de las neuronas adrenérgicas periféricas y, por tanto, del contenido

de NPY presente en las mismas. Si el tratamiento con esta sustancia ha sido efectivo al 100%, las fibras nerviosas que se observen tras el tratamiento, deben ser de origen no simpático. Es decir, si toda la IR para NPY desaparece tras tratamiento con 6-OH-DA, todas las fibras existentes en el tejido serán de origen simpático; si se observa un porcentaje, su origen será principalmente no simpático.

Nuestros hallazgos en cuanto a la gran deplección de los nervios NPY-IR tras el tratamiento con 6-OH-DA nos hace pensar que la mayoría, al menos, tiene un origen extrínseco y probablemente representan neuronas simpáticas postgangliónicas que se originan del ganglio estrellado y de otros ganglios paravertebrales donde se han identificado cuerpos celulares que contienen NPY (LUNDBERG ET AL, 1982; 1983; STERNINI Y BRECHA, 1985). Sin embargo, ya que no se ha realizado denervación quirúrgica no se puede excluir que la NPY-IR se derive también, al menos en parte, de otros orígenes extrínsecos.

Esto está de acuerdo con los resultados de diversos autores que muestran que la inervación por NPY es principalmente extrínseca de origen simpático (ALLEN ET AL, 1985; STERNINI Y BRECHA, 1985; DALSGAARD ET AL, 1986; WHARTON ET AL, 1988). Las fibras nerviosas NPY-IR en el sistema de conducción bovino también presentan inmunorreactividad para DA- β -hidroxilasa, lo que indica que derivan de los nervios simpáticos, aunque algunos nervios con DA- β -hidroxilasa no contienen NPY (FORSGREN, 1989a). Además, WARNER Y LEVY (1990b) han demostrado que la mayoría de las fibras simpáticas que contienen NPY que inervan el nodo SA se originan

en los ganglios del lado derecho mientras que los inervan el nodo AV se originan predominantemente en los ganglios del lado izquierdo (aunque también existe inervación bilateral). Esto está de acuerdo con la simetría existente en la inervación cardíaca simpática donde algunas regiones cardíacas están inervadas predominantemente por neuronas simpáticas postganglionares que se originan en el lado derecho o en el lado izquierdo (**WARNER Y LEVY, 1990b**).

La coexistencia de NPY y Nor en las mismas fibras está apoyada por los siguientes hallazgos: 1) La distribución de fibras NPY-IR es la misma que la de las fibras que contienen catecolaminas (**EHINGER ET AL, 1968; STERNINI Y BRECHA, 1985**); 2) los nervios NPY-IR, al igual que los nervios catecolaminérgicos, se eliminan o están marcadamente reducidos a igual magnitud tras tratamiento con 6-OH-DA. Estos datos sugieren que todas las fibras NPY-IR en el corazón, al igual que los nervios perivasculares NPY-IR en otros órganos periféricos (**LUNDBERG ET AL, 1982; 1983; EKBLAD ET AL, 1984**) contienen catecolaminas. Es interesante observar que el patrón de inervación del sistema cardiovascular por fibras NPY-IR difiere del observado en otros tejidos como el tracto gastrointestinal, donde: 1) la mayoría de los nervios catecolaminérgicos no vasculares no contienen NPY y 2) los nervios NPY-IR no necesariamente contienen catecolaminas (**LUNDBERG ET AL, 1983; STERNINI Y BRECHA, 1985**).

STERNINI Y BRECHA (1985) en cobayas, no encontraron evidencia de que exista coexistencia de NPY con fibras colinérgicas o con fibras que contengan otro

material peptidérgico. Estos y otros autores no han mostrado correspondencia entre la distribución y densidad de nervios NPY-IR con los que contienen acetilcolinesterasas (EHINGER ET AL, 1968; WHARTON ET AL, 1981), con VIP (WEIHE Y REINECKE, 1981; DELLA ET AL, 1983) ni con SP (REINECKE, WEIHE Y FORSSMANN, 1980; WEIHE Y REINECKE, 1981; WHARTON ET AL, 1981; HOUGLAND Y HOOVER, 1983). Por tanto, NPY coexiste con catecolaminas en el corazón y está separado de las presuntas fibras colinérgicas y sensitivas.

Aunque morfológicamente los diversos neuropéptidos parecen estar en distintas terminaciones nerviosas, AMERINI ET AL (1991) intentaron establecer si existen interacciones recíprocas entre los transmisores adrenérgicos y no-adrenérgicos-nocolinérgicos (NANC) en el corazón en preparaciones aisladas de aurícula de cobaya. Demostraron que Nor y otros cotransmisores (NPY y ATP) modulan la función eferente de las neuronas NANC sensibles a capsaicina ya que son capaces de inhibir la respuesta excitadora a la estimulación de los nervios sensitivos de forma concentración dependiente. Este efecto inhibitor parece realizarse a nivel preyuncional. Por el contrario, la neurotransmisión adrenérgica no se influye por los neuropéptidos de los terminales NANC como SP, NKA y CGRP ya que no modifican la respuesta cardíaca a la estimulación de campo eléctrico.

Por otro lado, hay que destacar que Nor, NPY y ATP se liberan de las terminaciones nerviosas cardíacas adrenérgicas en distintas condiciones patológicas como infarto agudo de miocardio e isquemia cardíaca. Se ha visto que estas situaciones indican

la liberación de los terminales nerviosos cardíacos NANC de CGRP que induce respuestas crono e inotrópico.

Por tanto, el control inhibitorio de la función eferente de las neuronas NANC por cotransmisión simpática puede representar un mecanismo importante de autoregulación en tales condiciones patológicas.

Podemos concluir de todo esto que, aunque los hallazgos morfológicos muestran que varios sistemas que contienen péptidos están implicados en la regulación de la función cardiovascular, y que parece que quizás cada uno de ellos tiene papeles separados, la evidencia fisiológica puede provocar que aunque en terminaciones nerviosas separadas interaccionan unas con otras para mantener una regulación de las funciones fisiológicas.

Por otro lado, la demostración en nuestro estudio de fibras nerviosas NPY-IR, fundamentalmente en la aurícula de los animales simpatectomizados (aunque en menor densidad que los no tratados) puede indicar que el péptido también existe en una subpoblación de nervios cardíacos intrínsecos. Dependiendo de la especie animal, se ha observado que NPY también puede estar localizado dentro de ciertas neuronas no adrenérgicas en los ganglios cardíacos intrínsecos, tanto in vivo (**MORRIS ET AL, 1986; GU ET AL, 1984**) como in vitro (**HASSALL Y BURNSTOCK, 1984**). No obstante, tanto en corazón bovino (**GORDON ET AL, 1993**) como en el humano (**WHARTON ET AL, 1990b**) no se han identificado células ganglionares NPY-IR

aunque **WHARTON ET AL (1990b)** han observado nervios aislados NPY-IR en los corazones transplantados.

Pero, por otra parte, la existencia de nervios NPY-IR tras el tratamiento con 6-OH-DA podría ser debido, no a un origen intrínseco sino a una simpatectomía incompleta. Pensamos, como hemos expuesto en el apartado anterior, que aunque existe un grado de variabilidad en la extensión de la simpatectomía entre animales, nuestro esquema de tratamiento con 6-OH-DA empleando diferentes dosis y distintos intervalos de tiempo, hace que podamos considerar la simpatectomía como completa y admitir la probable existencia de nervios cardíacos intrínsecos NPY-IR.

Además, los estudios mediante simpatectomía quirúrgica por **MACCARRONE Y JARROT (1987)** demostraron que el 50% del contenido de NPY en la AD de la rata no está presente en las neuronas simpáticas clásicas que se originan de los ganglios cervicales medio e inferior ya que, aunque la simpatectomía bilateral produjo deplección casi total del contenido de Nor de la AD (1,8% del total), el 50% de NPY-IR se observó en el tejido.

También **HASSALL Y BURNSTOCK (1984)** demostraron que alrededor del 20 al 50% de las neuronas intracardíacas eran NPY-IR. Este NPY, por tanto, no se localiza exclusivamente dentro de las fibras nerviosas simpáticas ya que no se han demostrado catecolaminas endógenas en los nervios intrínsecos del corazón (**HASSALL Y BURNSTOCK, 1984; DALSGAARD ET AL, 1986; FORSGREN, 1989a**). Esto es

similar a lo que ocurre en el intestino: **FURNESS ET AL (1983)**, han observado que algunas, pero no todas, las fibras noradrenérgicas extrínsecas encontradas en el intestino de cobaya expresan NPY-IR. Sin embargo, una población de neuronas intrínsecas NPY-IR también estuvo presente en los plexos submucoso y mientérico en regiones del intestino que no contienen cuerpos celulares nerviosos noradrenérgicos.

En el estudio de **FORSGREN (1989b)**, algunas células ganglionares NPY-IR se asociaron con el nodo SA aunque la gran mayoría no contenían NPY, ninguna de las células ganglionares contenía IR a tirosina hidroxilasa o DA- β -OHasa. Se identificaron finas fibras varicosas que contenían NPY sólo, DA- β -OHasa sólo o los dos juntos fuera de los ganglios y cercano a ellos. Esto puede indicar una íntima relación entre los nervios simpáticos y los nervios intrínsecos que contienen NPY y estos ganglios.

Mientras que **FORSGREN (1989a,c)** considera que las células ganglionares intrínsecas que contienen NPY posiblemente representen una subpoblación de células ganglionares parasimpáticas, **STERNINI Y BRECHA (1985)** observaron que no existe correlación entre la distribución de fibras nerviosas NPY-IR y la de las fibras nerviosas acetilcolinesterasa positivas. No obstante, se ha visto coexistencia con VIP en el corazón (**FORSGREN, 1989c**) y algunos autores han postulado que en el corazón parece haber al menos dos tipos de fibras nerviosas que contienen NPY: 1) las fibras nerviosas simpáticas y 2) neuronas intrínsecas, no simpáticas que contienen también VIP.

CORR ET AL (1990) han observado que la densidad de las fibras nerviosas simpáticas y no simpáticas que contienen NPY en el corazón no es constante sino que cambia con la maduración normal. Estudios en otros órganos han demostrado que también pueden cambiar con enfermedades tales como la hipertensión (**BURNSTOCK, 1990**) pero hasta la fecha no existe información sobre los cambios en la inervación peptidérgica del sistema de conducción del corazón con la edad o la enfermedad.

III) EFECTOS DERIVADOS DEL TRATAMIENTO CON CAPSAICINA

III.a.- VALORACION DEL METODO DE TRATAMIENTO CON CAPSAICINA

Mientras que dosis (en el rango de $\mu\text{g}/\text{kg}$) o concentraciones (en el rango de $\text{nM}-\mu\text{M}$) bajas de capsaicina estimulan las fibras nerviosas sensibles a esta sustancia, la administración de dosis sistémicas grandes (en el rango de mg/kg), origina una ablación funcional de dichas fibras (GAMSE ET AL, 1981; UCHIDA, YANO Y WATANABE, 1993). Los resultados obtenidos en este trabajo en animales pretratados con capsaicina ponen de manifiesto que esta sustancia origina una marcada reducción en el número de fibras SP-IR en todas las áreas estudiadas del corazón de la rata.

Para determinar la dosis apropiada de capsaicina que origine la mayor deplección de SP en el corazón y grandes vasos de la rata empleamos dos protocolos de tratamiento con capsaicina.

Al utilizar una dosis total de $260 \text{ mg}/\text{Kg}$ de capsaicina intraperitoneal (distribuida en 4 dosis sucesivas de 40, 40, 80 y $100 \text{ mg}/\text{Kg}$) y analizar los datos inmunohistoquímicos, apreciamos una desaparición casi completa de fibras nerviosas SP-IR. Solamente se observaron fibras ocasionales SP-IR en preparaciones aisladas.

Aunque diversos autores con dosis sistémicas menores de capsaicina han demostrado una deplección permanente de SP-IR en el corazón del cobaya: dosis totales de 110 mg/kg (PAPKA Y URBAN, 1987) y de 125 mg/kg (GAMSE ET AL, 1981; YONEI, HOLZER Y GUTH, 1990; UCHIDA, YANO Y WATANABE, 1993) nosotros, con las mismas dosis, encontramos fibras nerviosas SP-IR aunque en menor cantidad que en los animales no tratados, en diversas partes del corazón (miocardio auricular, nodo AV y grandes vasos). Se ha observado que una dosis total de 125 mg/kg deplecciona SP de los terminales nerviosos de la córnea, ganglio trigémino y nervio vago en ratas adultas (GAMSE ET AL, 1981).

Por el contrario, otros autores han empleado dosis mayores de capsaicina que las de estos autores y las nuestras. PAPKA ET AL (1981) y FURNESS ET AL (1982) administraron una dosis total de 775 mg/kg a cobayas observando una marcada deplección de SP en prácticamente en todos los nervios del sistema cardiovascular a los 45 y 60 días respectivamente. Pero aunque BUCK Y BURKS (1986), en cobayas, con una dosis total de 1250 mg/kg de capsaicina, objetivaron una marcada reducción del contenido de SP en el asta dorsal de la médula espinal, GAMSE ET AL (1981) observaron un efecto similar en esta zona con la décima parte de dicha dosis. Diversos estudios han demostrado que dosis mayores de 950 mg/kg de capsaicina no son más efectivas en producir alteración de los mecanismos nociceptivos en la rata que dosis menores (GAMSE, 1982; BUCK Y BURKS, 1986). Este dato, junto con los resultados morfológicos obtenidos aquí, indican que dosis extremadamente altas de capsaicina en ratas adultas no son más efectivas que las empleadas en nuestro estudio. Además la desaparición casi completa de las fibras nerviosas SP-IR en nuestro estudio, nos hace considerar como válido el esquema de tratamiento empleado.

III.b.- EFECTOS DE CAPSAICINA SOBRE LA DISTRIBUCION DE SP EN EL CORAZON Y GRANDES VASOS

Las fibras aferentes primarias de pequeño diámetro (tipo C no miélicas y tipo A 2 miélicas) proyectan información nociceptiva de los tejidos periféricos al SNC; muchas de tales fibras contienen SP como probable transmisor de la información aferente nociceptiva (**LUNDBERG ET AL, 1985a**).

Los ganglios sensitivos vagales y/o sensitivos de la raíz dorsal son los lugares potenciales de origen de las fibras nerviosas cardíacas SP-IR ya que se han demostrado cuerpos celulares SP-IR en las neuronas de estos ganglios (**URBAN Y PAPKA, 1985; PAPKA Y URBAN, 1987**). El origen de los nervios SP-IR del corazón se puede estudiar por métodos fisiológicos, por experimentos de sección de nervios y con la neurotoxina capsaicina. Estudios previos han establecido que capsaicina tiene una acción selectiva sobre ciertos tipos de neuronas sensitivas primarias que incluye la degeneración de las fibras tipo C y deplección de SP-IR de las fibras aferentes primarias (**PAPKA ET AL, 1981; LUNDBERG, HUA Y FRANCO-CERECEDA, 1984; PAPKA Y URBAN, 1987**). Este proceso también ocurre en aquellos nervios que inervan el corazón.

Nosotros encontramos que la inervación por fibras nerviosas SP-IR estuvo totalmente ausente de los corazones de la mayoría de las ratas tratadas con capsaicina (Figs. 126 a 135). En unos pocos casos, fibras nerviosas SP-IR parecieron resistentes al tratamiento con capsaicina (Fig. 136).

De estos datos podemos deducir que la inervación SP-IR se origina de NEURONAS SENSITIVAS PRIMARIAS (CUELLO, DEL FIACCO Y PAXINOS, 1978; GILLIS ET AL, 1980; HELKE, O'DONOHUE Y JACOBOWITZ, 1980) por diversas razones. En primer lugar, por el patrón de distribución de las fibras SP-IR en los nervios peri y paravasculares así como en nervios pericárdicos, epicárdicos, endocárdicos y valvulares habiéndose propuesto que las fibras nerviosas SP-IR son baro y/o quimiorreceptores del corazón (PAPKA ET AL, 1981; WEIHE Y REINECKE, 1981; WHARTON ET AL, 1981; REINECKE Y FORSSMANN, 1984) y del seno carotídeo (GILLIS ET AL, 1980; HELKE, O'DONOHUE Y JACOBOWITZ, 1980). En segundo lugar, por la evidencia en el presente estudio y en los de diversos autores de la deplección de SP en el corazón y vasos de una variedad de órganos y tejidos (PAPKA ET AL, 1981; FURNESS ET AL, 1982) tras administración de capsaicina, sustancia que afecta selectivamente las fibras nerviosas nociceptivas.

Además, el tratamiento con capsaicina de ratas en el período neonatal, origina una reducción significativa de la actividad refleja no cardíaca baro y quimiorreceptora (WEIHE, REINECKE Y FORSSMANN, 1984).

Las fibras nerviosas SP-IR descritas en este estudio probablemente están presentes en los nervios aferentes vagales que tienen receptores terminales en distintas localizaciones del corazón. En la rata, se ha observado que SP está presente en las fibras aferentes baro y quimiorreceptoras que terminan en el núcleo del tracto solitario (GILLIS ET AL, 1980; HELKE, O'DONOHUE Y JACOBOWITZ, 1980). Los cuerpos celulares de estas fibras

SP-IR están localizadas en el ganglio nodoso del vago (**LUNDBERG ET AL, 1978; HELKE, O'DONOHUE Y JACOBOWITZ, 1980; RECHARDT ET AL, 1986; TAY Y WONG, 1992**).

III.c.- EFECTOS DE CAPSAICINA SOBRE NPY Y VIP.

No se han observado diferencias significativas de densidad de inervación por fibras nerviosas NPY- y VIP-IR entre los animales pretratados con capsaicina y las ratas no tratadas. El tratamiento sistémico de animales adultos con capsaicina ha demostrado que no se alteran los niveles de VIP ni de NPY en el sistema cardiovascular o en las aferentes sensitivas en la medida que se deplecciona SP (**PAPKA ET AL, 1981; DELLA ET AL, 1983; BUCK Y BURKS, 1986**). Esta sustancia produce una pequeña reducción en los niveles de Somatostatina de las neuronas sensitivas (**GAMSE ET AL, 1981**), una disminución de Colecistoquinina del asta dorsal y una reducción parcial de Acetilcolinesterasa en el corazón (**PAPKA ET AL, 1981**).

Los resultados de nuestro estudio y los de otros autores indican, por tanto, que los efectos neuroquímicos de capsaicina son específicos para las neuronas aferentes primarias. Tanto en ratas como en cobayas, el tratamiento sistémico con capsaicina no depleccionó SP en el asta ventral, hipotálamo y otras áreas cerebrales, intestino y glándula adrenal. Además, capsaicina deplecciona SP de los tejidos susceptibles de días a semanas después del tratamiento, sin alteraciones o con cambios mínimos en los niveles de otros posibles neurotransmisores (**GAMSE ET AL, 1981; BUCK Y BURKS, 1986**).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- El estudio inmunohistoquímico del presente trabajo muestra que los nervios NPY-IR representan la subpoblación principal de nervios que contienen péptidos en el corazón de la rata y están ampliamente distribuidos en el tejido de conducción, aurículas, ventrículos, arterias coronarias y válvulas cardíacas.

2.- El sistema de conducción cardíaco presenta inervación por fibras nerviosas peptidérgicas (SP, NPY Y VIP) con diferencias en la densidad y distribución entre los tres neuropéptidos.

3.- El nodo SA muestra una densa inervación por fibras nerviosas SP- y NPY-IR, mayor para NPY. Por el contrario, no se observan fibras VIP-IR.

4.- En el septum interauricular, la densidad de inervación es baja para SP, tanto a nivel proximal como distal. Fibras nerviosas NPY- y VIP-IR se identifican en acúmulos localizados en la porción superior del septum.

5.- La mayor densidad de fibras nerviosas NPY-IR en el sistema de conducción se observa en el haz AV con fibras largas y con distribución heterogénea. Por el contrario, la distribución es homogénea y moderadamente densa para SP y VIP.

6.- En las ramas derecha e izquierda del haz AV, existen fibras nerviosas SP- y NPY-IR tanto a nivel proximal como distal. Sin embargo, la densidad para VIP es muy escasa o inexistente.

7.- La distribución y densidad de fibras nerviosas NPY-, SP- y VIP-IR en el subendocardio de ambos ventrículos es semejante, identificándose en la zona de inserción de las válvulas Mitral y Tricúspide. Mientras que en miocardio existe alta densidad de inmunorreactividad para NPY, no se observa para SP ni para VIP.

8.- La inervación de ambas aurículas es moderadamente densa para los tres neuropéptidos en subendocardio, miocardio y subepicardio.

9.- En la zona de inserción de las válvulas Mitral y Tricúspide se observa una densa inervación de fibras NPY-IR, moderada para SP y baja para VIP. Estas fibras no alcanzan nunca el borde libre de las valvas.

10.- Las arterias coronarias epicárdicas están densamente inervadas por fibras nerviosas peptidérgicas perivasculares. La mayor densidad corresponde a fibras nerviosas SP-IR; también se observa alta densidad de fibras nerviosas NPY-IR mientras que la inmunorreactividad para VIP es muy baja.

11.- En aorta, se observan fibras nerviosas SP-IR a nivel proximal, medio y distal. La densidad es menor para NPY y mucho menor para VIP. La densidad de inervación decrece de proximal a distal.

12.- En arteria pulmonar, la densidad de inervación es mucho menor para los tres neuropéptidos que la existente en aorta. Para NPY, sólo se observan fibras a nivel proximal y medio y no se identifican fibras nerviosas VIP-IR.

13.- En el espacio interaortopulmonar, se observan fibras nerviosas NPY- y VIP-IR intensamente fluorescentes. No se observan fibras nerviosas SP-IR.

14.- La administración intraperitoneal de 150 mg/kg de 6-OH-DA es un protocolo de tratamiento válido para realizar simpatectomía química en ratas. Con esta dosis, se consigue la deplección más completa de fibras nerviosas NPY-IR y similar a la producida con dosis mayores de esta sustancia.

15.- Mientras que existe una deplección significativa de fibras nerviosas NPY-IR tras simpatectomía química con 6-OH-DA, el tratamiento con esta sustancia no produjo modificaciones significativas en la densidad y distribución de las fibras nerviosas SP- y VIP-IR.

16.- Dosis totales de 260 mg/kg de capsaicina subcutánea, producen una desaparición prácticamente completa de las fibras nerviosas SP-IR.

17.- La capsaicina no alteró prácticamente el patrón de densidad y distribución de las fibras nerviosas NPY- y VIP-IR.

BIBLIOGRAFIA

ABERDEEN J, MILNER P, LINCOLN J, BURNSTOCK G.

Guanethidine sympathectomy of mature rats leads to increases in calcitonin gene-related peptide and vasoactive intestinal polypeptide-containing nerves.
Neuroscience 1992; 47: 453-461.

ALBEGGER K, HAUSER-KRONBERGER CE, SARIA A, GRAF AH, BERNATZKY G, HACKER GW.

Regulatory peptides and general neuroendocrine markers in human nasal mucosa, soft palate and larynx.
Acta Otolaryngol (Stockh) 1991; 111: 373-378.

ALLEN JM, BIRCHAM PMM, EDWARDS AV, TATEMOTO K, BLOOM SR.

Neuropeptide Y (NPY) reduces myocardial perfusion and inhibits the force of contraction of the isolated perfused heart.
Regul Pept 1983; 6: 247-253.

ALLEN JM, POLAK JM, RODRIGO J, DARCY K, BLOOM SR.

Localization of neuropeptide Y in nerves of the rat cardiovascular system and the effect of 6-hydroxidopamina. Cardiovasc Research 1985a; 19: 570-577.

ALLEN JM, RAINE AEG, LEDINGHAM JGG, BLOOM SR.

Neuropeptide Y: A novel renal peptide with vasoconstrictor and natriuretic activity.
Clin Sci 1985b; 68: 373-377.

ALLEN JM, BLOOM SR.

Neuropeptide Y: A putative neurotransmitter.
Neurochem Int 1986; 8: 1-8.

ALLEN JM, GJORSTRUP P, BJORKMAN JA, ABRAHAMSON LEK, BLOOM SR.

Studies on cardiac distribution and function of NPY.
Acta Physiol Scand 1986; 126: 405-411.

AMENTA F, CAVALOTTI C, COLLIER WL, FERRANTE F, GEPPETTI P, RICCI A.

Autoradiographic localization of vasoactive intestinal polypeptide receptors in the rat mesenteric vascular tree. Regul Pept 1989; 26: 9-17.

AMERINI S, RUBINO A, FILIPPI S, LEDDA F, MANTELLI L.

Modulation by adrenergic transmitters of the efferent function of Capsaicin-sensitive nerves in cardiac tissue.
Neuropeptides 1991; 20: 225-232.

ANDERSON RH.

The disposition, morphology and innervation of cardiac specialized tissue in the guinea pig.
J Anat 1972; 19: 453-465.

ANDERSON RM, BECKER AE.

Atlas fotográfico de Anatomía Cardíaca.
Ediciones Doyma, Barcelona, 1981.

ANDERSON FL, WYNN JR, KIMBALL J, HANSON GR, HAMMOND E, HERSHBERGER R, KRALIOS AC.

Vasoactive intestinal peptide in canine hearts: effect of total cardiac denervation.
Am J Physiol 1992; 262: H598-H602.

BALASUBRAMANIAM A, GRUPP I, MATLIB MA, BENZA R, JACKSON RL, FISCHER JE, GRUPP G.

Comparison of the effects of neuropeptide Y (NPY) and 4-norleucine-NPY on isolated perfused rat hearts; effects of NPY on atrial and ventricular strips of rat heart and on rabbit heart mitochondria.
Regul Pept 1988; 21: 289-299.

BALASUBRAMANIAM A, SHERIFF S, FERGUSON DG, STEIN M, RIGEL DF.

N-alfa-biotinylated-Neuropeptide Y analogs: Syntheses, cardiovascular properties, and application to cardiac NPY receptor visualization.
Peptides 1990a; 11: 1151-1156.

BALASUBRAMANIAM A, SHERIFF S, RIGEL DF, FISCHER JE.

Characterization of Neuropeptide Y binding sites in rat cardiac ventricular membranes.
Peptides 1990b; 11: 545-550.

BALUCK P, GABELLA G.

Some intrinsic neurons of the guinea-pig heart contain substance P.
Neurosci Lett 1989; 104: 269-273.

BARBER RP, VANGHN SE, SLEMMON JR, SALVATERRA PM, ROBERTS E, LEEMAN SE.

The origin, distribution and synaptic relationships of substance P axons in rat spinal cord.
J Comp Neurol 1979; 184: 331-352.

BARNES PJ.

Neural mechanisms in asthma.
Br Med Bull 1992; 48: 149-168.

BELLINGER DL, LORTON D, ROMANO T, OLSCHOWKA JA, FELTEN SY, FELTEN DL.

Neuropeptide innervation of lymphoid organs.
Ann N Y Acad Sci 1990; 592: 17-33.

BENY JL, BRUNET PC, HUGGEL H.

Effect of mechanical stimulation, substance P and vasoactive intestinal polypeptide on the electrical and mechanical activities of circular smooth muscles from pig coronary arteries contracted with acetylcholine: role of endothelium.
Pharmacology 1986; 33: 61-68.

BESSON J, ROTSZTEJN W, POUSSIN B, LHIAUBET AM, ROSSELIN G.

Release of VIP from rat brain slices by various depolarizing agents.
Neurosci Lett 1982; 28: 281-285.

BESSON J, SARRIEAU A, VIAL M, MARIE JC, ROSSELIN G, ROSTENE W.

Characterization and autoradiographic distribution of vasoactive intestinal peptide binding sites in the rat Central Nervous System.
Brain Res 1986; 398: 329-336.

BLOOM SR, POLAK JM.

Regulatory peptides and the skin.
Clin Dermatol 1983; 8: 3-18.

BOURNE JA.

Handbook of immunoperoxidase staining methods.
DAKO Corporation, USA, 1983.

BRADFORD HF.

Fundamentos de Neuroquímica.
Ed. Labor SA Calabria, Barcelona 1988.

BRUM JM, BOVE AA, SUFAN Q, REILLY W, GO VLW.

Action and localization of vasoactive intestinal peptide in the coronary circulation: Evidence for nonadrenergic, noncholinergic coronary regulation.
J Am Coll Cardiol 1986; 7: 406-413.

BUCK SH, BURKS TF.

The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations.
Pharmacol Rev 1986; 38: 179-226.

BUCSICS A, HOLZER P, LEMBECK F.

The substance P content of peripheral tissues in several mammals.
Peptides 1983; 4: 451-455.

**BURKHOLDER T, CHAMBERS M, HOTMIRE K, WURSTER RD, MOODY S,
RANDALL WC.**

Gross and Microscopic Anatomy of the vagal innervation of the rat heart.
The Anatomical Record 1992; 232: 444-452.

BURNSTOCK G.

Nervous control of smooth muscle by transmitters, cotransmitters and modulators.
Experientia 1985; 41: 869-874.

BURNSTOCK G.

The changing face of autonomic neurotransmission.
Acta Physiol Scand 1986; 126: 67-91.

BURNSTOCK G.

Co-transmission.
Arch Int Pharm Ther 1990; 304: 7-33.

CALVO JR, MONTILLA ML, GUERRERO JM, SEGURA JJ.

Expression of VIP receptors in mouse peritoneal macrophages: Functional and molecular characterization.
J Neuroimmunol 1994; 50: 85-94.

CAMPBELL SE, MARTIN GERDES R, SMITH TD.

Comparison of regional differences in cardiac myocyte dimensions in rats, hamsters, and guinea pigs.
Anat Rec 1987; 219: 53-59.

CARLQUIST M, MUTT V, JORNVALL H.

Isolation and characterisation of bovine vasoactive intestinal peptide (VIP).
FEBS Lett 1979; 108: 457-460.

CARLSQUIST M, McDONALD TJ, GO VLW, BATAILLE D, JOHANSSON C, MUTT V.

Isolation and aminoacid composition of human vasoactive intestinal polypeptide (VIP).
Horm Metab Res 1982; 14: 28-29.

CARPENTER MB.

Core text of Neuroanatomy. Fourth ed.

Williams and Wilkins (eds). Satterfield TS: Baltimore, 1991.

CHANG MM, LEEMAN SE.

Isolation of a sialogogic peptide from bovine hypothalamic tissue and its characterization as substance P.

J Biol Chem 1970; 245: 4784-4790.

CHANG MM, LEEMAN SE, NIALL HD.

Aminoacid sequence of substance P.

Nature New Biol 1971; 232: 86-87.

CHANG F, YU HG, COHEN IS.

Actions of VIP and NPY on the pacemaker current in canine Purkinje fibers.

Circ Res 1994; 74: 157-162.

CHIGR F, NAJIMI M, LEDUQUE P, CHAYVIALLE JA, BOUVIER R, KOPP N.

Anatomical distribution of substance P-immunoreactive neurons in human brainstem during the first postnatal year.

Brain Res Bull 1991; 26: 515-523.

CHOW LT, CHOW SS, ANDERSON RH, GOSTING JA.

Innervation of the human cardiac function system at birth.

Br Heart J 1993; 69: 430-435.

CHRONWALL BM, CHASE TN, O'DONOHUE TL.

Coexistence of neuropeptide Y and somatostatin in human cortical and rat hypothalamic neurons.

Neurosci Lett 1984; 52: 213-217.

CIARLEGLIO AE, BEINFELD MC, WESTFALL TC.

Pharmacological characterization of the release of neuropeptide-Y-like immunoreactivity from the rat hypothalamus.

Neuropharmacology 1993; 32: 819-825.

COHEN HL.

Development of autonomic innervation in mammalian myocardium. In: Developmental Neurobiology of the Autonomic Nervous System. Ed. by Phyllis M. Gootman, The Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey, 1986, pp 159-191.

COONS AM.

Fluorescent Antibody Methods.

In: *General Cytochemical Methods*. J.D. Danielli (Editors), Academic Press, New York, 1958, pp 399-422.

CORCORAN BM, HAIGH AL.

The effect of tachykinins on sheep bronchomotor tone.
Exp Physiol 1992; 77: 471-479.

CORR LA, ABERDEEN JA, MILNER P, LINCOLN J, BURNSTOCK G.

Sympathetic and Nonsympathetic neuropeptide Y-containing nerves in the rat myocardium and coronary arteries.
Circulation Research 1990; 66: 1602-1609.

CORR L.

Neuropeptides and the conduction system of the heart.
Int J Cardiol 1992; 35: 1-12.

COUTURE R, GAUDREAU P, St-PIERRE S, REGOLI D.

The dog common carotid artery: a sensitive bioassay for studying vasodilator effects of substance P and of kinins.
Can J Physiol Pharmacol 1980; 58: 1234-1244.

CROWE R, KAMM MA, BURNSTOCK G, LENNARD-JONES JE.

Peptide-containing neurons in different regions of the submucous plexus of human sigmoid colon.
Gastroenterology 1992; 102: 461-467.

CUELLO AC, DEL FIACCO M, PAXINOS G.

The central and peripheral ends of the substance-P-containing sensory neurons in the rat trigeminal system.
Brain Res 1978; 152: 499-509.

CUELLO AC, KANAZAWA I.

The distribution of substance P Immunoreactive fibers in the rat Central Nervous System.
J Comp Neurol 1978; 178: 129-156.

DALE H.

Pharmacology and nerve-endings.
Proc. R. Soc. Med. 1935; 28: 319-332.

DALSGAARD CJ, FRANCO-CERECEDA A, SARIA A, LUNDBERG JM, THEODORSSON-NORHEIM E, HÖKFELT T.

Distribution and origin of substance P- and Neuropeptide Y-immunoreactive nerves in the guinea-pig heart.

Cell. Tissue Res. 1986; 243: 477-485.

DE KONINCK Y, RIBEIRO-DA-SILVA A, HENRY JL, CUELLO AC.

Spinal neurons exhibiting a specific nociceptive response receive abundant Substance P-containing synaptic contacts.

Proc. Natn. Acad. Sci. USA 1992; 89: 5073-5077.

DE SOUZA EB, SEIFERT H, KUCHAR MJ.

Vasoactive intestinal peptide receptor localization in rat forebrain by autoradiography.

Neurosc. Lett. 1985; 56: 113-120.

DELLA NG, PAPKA RE, FURNESS JB, COSTA M.

Vasoactive intestinal peptide-like immunoreactivity in nerves associated with the cardiovascular system of guinea-pigs.

Neuroscience 1983; 9: 605-619.

DIMALINE R, REEVE JR, SHIVELEY JE, HAWKE D.

Isolation and characterization of rat vasoactive intestinal peptide.

Peptides 1984; 5: 183-187.

DOLEZEL S, GEROVA M, GERO J, SLADEK T, VASK J.

Monoaminergic pathways to the coronary arteries and to the miocardium.

Acta Anat 1980; 108: 490-497.

DOMOTO T, BISHOP AE, OKI M, POLAK JM.

An in vitro study of the projections of enteric vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive neurons in the human colon.

Gastroenterol 1990; 98: 819-827.

DOYLE CA, MAXWELL DJ.

NPY-IR terminals form axo-axonic synaptic arrangements in the substantia gelatinosa (lamina II) of the cat spinal dorsal horn.

Brain Res 1993; 603: 157-161.

DUBOIS-RANDE JL, COMOY E, MERLET P, BENVENUTI C, CARVILLE C, HITTINGER L, MACQUIN-MAVIER I, BOHNON C, CASTAIGNE A.

Relationship among neuropeptide Y, catecholamines and haemodynamics in congestive heart failure.

Eur. Heart J. 1992; 13: 1233-1238.

EBEID AM, ATTIA RR, SUNDARAM P, FISCHER JE.

Release of VIP in the central nervous system in man.

Am J Surg 1979; 137: 123-127.

ECKENSTEIN F, BAUGHMAN RW.

Two types of cholinergic innervation in cortex, one co-localized with vasoactive intestinal polypeptide.

Nature 1984; 309: 153-155.

EDVINSSON L, HAKANSON R, WAHLESTEDT C, UDDMAN R.

Effects of neuropeptide Y on the cardiovascular system.

Trends Pharmacol Sci 1987; 8: 231-235.

EHINGER B, FALCK B, PERSSON H, SPORRONG B.

Adrenergic and Cholinesterase-containing neurons of the heart.

Histochemie 1968; 16: 197-207.

EKBLAD E, EDVINSSON L, WAHLESTEDT C, UDDMAN R, HAKANSON R, SUNDLER F.

Neuropeptide co-exists and co-operates with noradrenaline in perivascular nerve fibers.

Regul. Pept. 1984; 8: 225-235.

EKLUND S, JODAL M, LUNDGREN O, SJOGVIST A.

Effects of vasoactive intestinal polypeptide on blood flow, motility and fluid transport in the gastrointestinal tract of the cat.

Acta Physiol Scand 1979; 105: 461-468.

EMSON PC.

Peptides as neurotransmitters candidates in the CNS.

Prog Neurobiol 1979; 13: 61-116.

ENDO M, ARITA J, FUJITA K, KIMURA F.

Mechanism for the cardiovascular action of intracerebroventricularly administered vasoactive intestinal polypeptide in rats.

Exp Clin Endocrinol 1991; 97: 55-62.

EVERITT BJ, HÖKFELT T, TERENIUS L, TATEMOTO K, MUTT V, GOLDSTEIN M.

Differential coexistence of neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity with catecholamines in the central nervous system of the rat.

Neuroscience 1984; 11: 443-462.

FALCK B, HILLARP NA, THIEME G, THORP H.

Fluorescence of catecholamines and related compounds condensed with formaldehyde.
J Histochem Cytochem 1962; 10: 348-354.

FLOOD JF, GARLAND JS, MORLEY JE.

Vasoactive Intestinal Peptide (VIP): An amnestic neuropeptide.
Peptides 1990; 11: 933-938.

FLOYD K.

Light microscopy of nerve endings in the atrial endocardium.
Cardiac Receptors. Chapter 1.
Cambridge University Press. Oxford, 1979: pp.3-26.

FORSGREN S.

The distribution of terminal sympathetic nerve fibers in bundle branches and false tendons of the bovine heart. An immunohistochemical and catecholamine histofluorescence study.
Anat Embryol 1988; 177: 437-443.

FORSGREN S.

Neuropeptide Y-like immunoreactivity in relation to the distribution of sympathetic fibers in the heart conduction system.
J Mol Cell Cardiol 1989a; 21: 279-290.

FORSGREN S.

The distribution of nerve fibers showing substance P-like immunoreactivity in the conduction system of the bovine heart: dense innervation in the atrioventricular bundle.
Anat Embryol 1989b; 179: 485-490.

FORSGREN S.

Vasoactive Intestinal Polypeptide-like immunoreactivity in the bovine heart: high degree of coexistence with neuropeptide Y-like immunoreactivity.
Cell Tissue Res 1989c; 256: 125-135.

FORSSMANN WG, REINECKE M, WEIHE E.

Cardiac innervation.

In: Systemic Role of Regulatory Peptides. Edited by SR Bloom, JM Polak, E Lindennlanb FK Schottaner Verlag. Stuttgart 1982, pp 329-349.

FORSSMANN WG, TRIEPEL J, DAFFNER C, HEYM CH, CUEVAS P, NOBLE MIM, YANAIHARA N.

Vasoactive intestinal peptide in the heart.
Ann NY Acad Sci 1988; 527: 405-420.

FRANCO-CERECEDA A, LUNDBERG JM, DAHLOF C.

Neuropeptide Y and sympathetic control of heart contractility and coronary vascular tone.
Acta Physiol Scand 1985; 124:361-369.

FRANCO-CERECEDA A, LUNDBERG JM.

Potent effects of neuropeptide Y and calcitonin gene-related peptide on human coronary vascular tone in vitro.
Acta Physiol Scand 1987; 131: 159-160.

FRANCO-CERECEDA A, ÖWALL A, SETTERGREN G, SOLLEVI A, LUNDBERG JM.

Release of neuropeptide Y and noradrenaline from the human heart after aortic occlusion during coronary artery surgery.
J Cardiothorac Anesth 1989; 3:66.

FRASE LL, GAFFNEY A, LANE LD, BUCKEY JC, SAID SI, BLOMQUIST G, KREJS GJ.

Cardiovascular effects of vasoactive intestinal peptide in healthy subjects.
Am J Cardiol 1987; 60: 1356-1361.

FRIED G, TERENIUS L, HÖKFELT T, GOLDSTEIN M.

Evidence for the differential localization of noradrenaline and neuropeptide Y (NPY) in neuronal storage vesicles isolated from rat vas deferens.
J Neurosci 1985; 5: 450-458.

FURNESS JB, PAPKA RE, DELLA NG, COSTA M, ESKAY RL.

Substance P-like immunoreactivity in nerves associated with the vascular system of guinea pigs.
Neuroscience 1982; 7: 447-459.

FURNESS JB, COSTA M, EMSON PC, HAKANSON R, MOGHIMZADEH E, SUNDLER F, TAYLOR IL, CHANCE RE.

Distribution, pathways and reactions to drug treatment of nerves with NPY- and pancreatic polypeptide-like immunoreactivity in the guinea-pig digestive tract.
Cell Tissue Res 1983; 234: 71-92.

FURNESS JB, COSTA M, PAPKA RE, DELLA NG, MURPHY R.

Neuropeptides contained in peripheral cardiovascular nerves.
Clin Exper Hyper Theory Prac 1984; A6: 91-106.

FUXE K, AGUATI LF, HARFSTRAND A, ZINI I, TATEMOTO K, PICH EM, HÖKFELT T, MUTT V, TERENIUS L.

Central administration of neuropeptide Y induces hypotension, bradypnea and EEG synchronization in the rat.
Acta Physiol Scand 1983; 118: 187-192.

GAINER H, BROWNSTEIN MJ.

Neuropeptides.

En: Siegel GJ, Albers RW, Agranoff BW, Katzman R. Basic Neurochemistry. Boston, Little Brown, 1981; pp.260-289.

GALLAGHER AW, CHAHL LA, LYNCH AM.

Distribution of substance P-like immunoreactivity in guinea pig central nervous system. Brain Res Bull 1992; 29: 199-207.

GAMSE R, LEEMAN S, HOLZER P, LEMBECK F.

Differential effects of capsaicin on the content of somatostatin, substance P and neurotensin in the nervous system of the rat.

Naunyn Schmiedeberg'Arch Pharmacol 1981; 317: 140-148.

GAMSE R.

Capsaicin and nociception in the rat and mouse.

Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1982; 320: 205-216.

GERSTHEIMER FP, SIMON T, KÖLB J, HÖPKER W, METZ J.

Computer-assisted morphometric study of the innervation of the guinea pig heart. Histochemistry 1988; 88: 545-551.

GIL LOYZAGA P.

Comunicación personal, 1992.

GILLIS RA, HELKE CJ, HAMILTON BL, NORMAN WP, JACOBOWITZ DM.

Evidence that substance P is a neurotransmitter of baro- and chemoreceptor afferents in nucleus tractus solitarius.

Brain Research 1980; 181: 476-481.

GORDON L, WHARTON J, GAER JAR, INGLIS GC, TAYLOR KM, POLAK JM.

Quantitative immunohistochemical assesment of bovine myocardial innervation before and after cryosurgical cardiac dennervation.

Cardiovasc Res 1993; 27: 318-326.

GREENWOOD B, DOOLITTLE T, SEE NA, KOCH TR, DODDS WJ, DAVISON JS.

Effects of substance P and vasoactive intestinal polypeptide on contractile activity and epithelial transport in the ferret jejunum.

Gastroenterology 1990; 98: 1509-1517.

GRONBECH JE, LACY ER.

SP attenuates gastric mucosal hyperemia after stimulation of sensory neurons in the rat stomach.

Gastroenterology 1994; 106: 440-449.

GU J, ADRIAN TE, TATEMOTO K, POLAK JM, ALLEN JM, BLOOM SR.
Neuropeptide Tyrosine (NPY). A major cardiac neuropeptide.
The Lancet 1983; 7: 1008-1010.

GU J, POLAK JM, ALLEN JM, HUANG WM, SHEPPARD MN, TATEMOTO K, BLOOM SR.
High concentrations of a novel peptide, neuropeptide Y in the innervation of mouse and rat heart.
Histochem Cytochem 1984; 32: 467-472.

GULBENKIAN S, EDVINSSON L, OPGAARD OS, VALENÇA A, WHARTON J, POLAK JM.
Neuropeptide Y modulates the action of vasodilator agents in guinea-pigs epicardial coronary arteries.
Regul Pept 1992; 40: 351-362.

GULBENKIAN S, SAETRUM OPGAARD O, COSTA ANDRADA N, WHARTON J, POLAK JM, QUEIROZ C, MELO J, EDVINSSON L.
Peptidergic innervation of human epicardial coronary arteries.
Circulation Res 1993; 73: 579-588.

HAEUSLER G, OSTEWLDER R.
Evidence suggesting a transmitter or neuromodulatory role for substance P at the first synapse of the baroreceptor reflex.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmac 1980; 314: 111-121.

HARA H, HAMILL GS, JACOBOWITZ DM.
Origin of cholinergic nerves to the rat major cerebral arteries: Coexistence with vasoactive intestinal polypeptide.
Brain Res Bull 1985; 14: 179-188.

HARTMAN BK.
Immunofluorescence of Dopamine- β -hydroxylase. Application of improved methodology to the localization of the Peripheral and Central Noradrenergic Nervous System.
J Histochem Cytochem 1973; 21: 312.

HASSALL CJS, BURNSTOCK G.
Neuropeptide Y-like immunoreactivity in cultured intrinsic neurons of the heart.
Neurosci Lett 1984; 52: 111-115.

HASSALL CJS, BURNSTOCK G.

Immunocytochemical localization of neuropeptide Y and 5-hydroxytryptamine in a subpopulation of amine-handing intracardiac neurons that do not contain dopamine- β -hydroxylase in tissue culture.
Brain Res 1987; 422: 74-82.

HEISTAD DD, MARNUS ML, SAID SI, GROSS PM.

Effect of acetylcholine and vasoactive intestinal peptide of cerebral blood flow.
Am J Physiol 1980; 239: H73-H80.

HELKE CJ, O'DONOHUE TL, JACOBOWITZ DM.

Substance P as a baro- and chemoreceptor afferent neurotransmitter: Immunocytochemical and neurochemical evidence in the rat.
Peptides 1980; 1: 1-9.

HELKE CJ.

Neuroanatomical localization of substance P: Implications for Central Cardiovascular Control.
Peptides 1982; 3: 479-483.

HÖKFELT T, FUXE K, GOLDSTEIN M.

Applications of Immunohistochemistry to studies on monoamine cell systems with special references to Nervous tissue.
Ann New York Acad Sci 1975; 254: 407.

HÖKFELT T, JOHANSSON O, KELLERTH JO, LJUNDAHL A, NILSSON G, NYGÅRDS A, PERNOW B.

Immunohistochemical distribution of substance P.
In Substance P (Nobel Symposium 37), ed. by VS von Euler and B Pernow. Raven Press: New York, 1977; pp. 117-145.

HÖKFELT T, JOHANSSON O, LJUNDAHL A, LUNDBERG JM, SCHULTZBERG M.

Peptidergic neurones.
Nature (Lond) 1980; 284: 515-521.

HÖKFELT T, MILLHORN D, SEROOGY K, TSUMO Y, CECCATELLI S, LINDH B, MEISTER B, MELANDER T, SCHALLING M, BARTFAI T, TERENTIUS L.

Coexistence of peptides with classical neurotransmitters.
Experientia 1987; 42: 768-780.

HOOVER DB.

Effects of guinea pig vasoactive intestinal peptide on the isolated perfused guinea pig heart.
Peptides 1989; 10: 343-347.

HOUGLAND MW, HOOVER DB.

Detection of substance P-like immunoreactivity in nerve fibers in the heart of the guinea-pigs but not rats.

J Autom Nervous System 1983; 8: 295-301.

HOVELACQUE A.

Anatomie des nerfs crâniens et rachidiens et du système grand sympathique chez l'homme.

Librairie Octave Doin, Paris, 1927.

HUANG M, RORSTAD OP.

VIP receptors in mesenteric and coronary arteries: a radioligand binding study.

Peptides 1987; 8: 477-485.

ICHIKAWA H, NISHIKAWA S, WAKISAKA S, MATSNO S, TAKANO Y, AKAI M.

Occurrence of substance P-like immunoreactivity nerve fibers in Krause corpuscles of the dog's tongue.

Acta Anat 1988; 131: 215-217.

JAMES TN.

The sinus node.

Am J Cardiol 1977; 40: 965-986.

JOHANSSON O, HÖKFELT T, PERNOW B, JEFFCOATE SL, WHITE N, STEINBUSCH HWM, VERHOFSTAD AAJ, EMSON PC, SPINDEL E.

Immunohistochemical support for three putative transmitters in one neuron: Coexistence of 5-hydroxytryptamine, substance P and thyrotropin releasing hormone-like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord.

Neuroscience 1981; 6: 1857-1881.

JOTWANI G, ITOH K, WADHWA S.

Immunohistochemical localization of tyrosine hydroxylase, SP, NPY and leucine-enkephalin in developing human retinal amacrine cells.

Develop Brain Res 1994; 77: 285-289.

KAGE R, LEEMAN SE, BOYD ND.

Biochemical characterization of two different forms of the substance P receptor in rat submaxillary gland.

J Neurochem 1993; 60: 347-351.

KALIVAS PW.

Neurotransmitter regulation of dopamine neurons in the ventral tegmental area.

Brain Res Reviews 1993; 18: 75-113.

KARASAWA Y, FURUKAWA Y, REN LM, TAKEI M, MURAKAWI M, NAVITA M, CHIBA S.

Cardiac responses to VIP and VIP-ergic-cholinergic interaction in isolated dog heart preparations.

Eur J Pharmacol 1990; 187: 9-17.

KAWAMURA K, SAKATA N, TAKEBAYASHI S.

Neuropeptide Y- and vasoactive intestinal polypeptide- containing nerve fibers in the human cerebral arteries: characteristics of distribution.

Angiology 1991; 42: 35-43.

KNIGHT DS, FABRE RD, BEAL JA.

Identification of noradrenergic nerve terminals immunoreactive for neuropeptide Y and vasoactive intestinal peptide in the rat kidney.

Am J Anat 1989; 184: 190-204.

KOMISARUK BR, BANAS C, HELKER SB, WHIPPLE P, BARBATO GF, JORDAN F.

Analgesia produced by vasoactive intestinal peptide administered directly to the spinal cord in rats.

Ann NY Acad Sci 1989; 32: 650-654.

KOSTRZEWA RM, JACOBOWITZ DM.

Pharmacological actions of 6-Hydroxydopamine.

Pharmacological Rev 1974; 26: 199-288.

KRIEGER DT.

An overview of neuropeptides.

In: Neuropeptides in Neurologic and Psychiatric disease. Ed. JB Martin and JD Barchas. Raven Press: New York, 1986 pp. 1-32.

LARSEN JJ, BOECK V, OTTENSEN B.

Effect of vasoactive intestinal polypeptide on cerebral blood flow in the goat.

Acta Physiol Scand 1981; 111: 471-474.

LARSSON LI, FAHRENKRUNG J, SCHAFFALITZKY DE MUCKADELL O, SUNDLER F, HÅKANSON R, REHFELD JF.

Localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) to central and peripheral neurons.

Proc Natl Acad Sci 1976; 73: 3197-3200.

LEANDER S, BRODIN E, HÅKANSON R, SUNDLER F, UDDMAN R.

Neuronal substance P in the esophagus. Distribution and effects on motor activity.

Acta Physiol Scand 1982; 115: 427-435.

LEE CM, IVERSEN LL, HANLEY MR, SANDBERG BEB.

The possible existence of multiple receptors for substance P.
Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1982; 318: 281-287.

LIN HT, BROWN JL, JASMIN L, MAGGIO JE, VIGNA SR, MANTYH PW, BASBAUM AI.

Synaptic relationship between SP and the SP Receptor. Light and Electron Microscopic characterization of the mismatch between neuropeptides and their receptors.
Proc Nat Acad Sci USA 1994; 91: 1009-1016.

LJUNGDAHL Å, HÖKFELT T, NILSSON G.

Distribution of substance P-like immunoreactivity in the Central Nervous System of the rat. I. Cells bodies and nerve terminals.
Neuroscience 1978a; 3: 861-944.

LJUNGDAHL Å, HÖKFELT T, NILSSON G, GOLDSTEIN M.

Distribution of substance P-like immunoreactivity in the Central Nervous System of the rat. II. Light microscopic localization in relation to catecholamine-containing neurons.
Neuroscience 1978b; 3: 945-976.

LOESCH A, BURNSTOCK G.

Ultrastructural localisation of serotonin and SP in vascular endothelial cells of rat femoral and mesenteric arteries.
Anat Embryol 1988; 178: 137-142.

LOEWI O.

Ünger humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung.
Pflügers Arch Gesamte Physiol 1921; 189: 239-242.

LORTON D, BELLINGER DL, FELTEN SY, FELTEN DL.

Substance P innervation of the rat thymus.
Peptides 1990; 11: 1269-1275.

LOSAY J, MROZ EA, TREGEAR GW, LEEMAN SE, GAMBLE WJ.

Action of substance P on the coronary blood flow in the isolated dog heart.
In: Substance P. VS von Euler and B Pernow (eds), Raven Press: New York, 1977, pp. 287-294.

LUNDBERG JM, HÖKFELT T, NILSSON G, TERENIUS L, REHFELD J, ELDE R, SAID S.

Peptide neurons in the vagus, splanchnic and sciatic nerves.
Acta Physiol Scand 1978; 104: 499-501.

LUNDBERG JM, HÖKFELT T, SCHULTZBERG M, UVNÄS-WALLENSTEN K, KÖHLER C, SAID SI.

Occurrence of vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-like immunoreactivity in certain cholinergic neurons of the cat: evidence from combined immunohistochemistry and acetylcholinesterase staining.

Neuroscience 1979; 4: 1539-1559.

LUNDBERG JM, FRIED G, FAHRENKRUNG J, HOLMSTEDT B, HÖKFELT T, LAGERCRANTZ H, LUNDGREN G, ÅNGGÅRD A.

Subcellular fractionation of cat submandibular gland: Comparative studies on the distribution of acetylcholine and vasoactive intestinal polypeptide (VIP).

Neuroscience 1981; 6: 1001-1010.

LUNDBERG JM.

Evidence for coexistence of VIP and acetylcholine in neurons of cat exocrine glands. Morphological biochemical and functional studies.

Acta Physiol Scand 1981; Suppl 496.

LUNDBERG JM, TATEMOTO K.

Pancreatic polypeptide family (APP, BPP, NPY and PYY) in relation to sympathetic vasoconstriction resistant to sympathetic alpha-adrenoreceptor blockade.

Acta Physiol Scand 1982; 116: 393-402.

LUNDBERG JM, TERENIUS L, HÖKFELT T, MARTLING R, TATEMOTO K, MUTT V, POLAK J, BLOOM S, GOLDSTEIN M.

Neuropeptide Y (NPY)-like immunoreactivity in peripheral noradrenergic neurons and effects of NPY on sympathetic function.

Acta Physiol Scand 1982; 116: 477-480.

LUNDBERG JM, HÖKFELT T.

Coexistence of peptides and classical neurotransmitters.

TINS 1983; 6: 325-333.

LUNDBERG JM, TERENIUS L, HÖKFELT T, GOLDSTEIN M.

High levels of neuropeptide Y in peripheral noradrenergic neurons in various mammals including man.

Neurosci Lett 1983; 42: 167-172.

LUNDBERG JM, HUA XY, FRANCO-CERECEDA A.

Effects of neuropeptide Y (NPY) on mechanical activity and neurotransmission in the heart, vas deferens and urinary bladder of the guinea-pig.

Acta Physiol Scand 1984; 121: 325-332.

LUNDBERG JM, FRANCO-CERECEDA A, HUA X, HÖKFELT T, FISCHER JA.
Coexistence of substance P and calcitonin gene-related peptide like immunoreactivities in sensory nerves in relation to cardiovascular and bronchoconstrictor effects of capsaicin.
Eur J Pharmacol 1985a; 108: 315-319.

LUNDBERG JM, SARIA A, FRANCO-CERECEDA A, HÖKFELT T, TERENCEUS L, GOLDSTEIN M.
Differential effects of reserpine and 6-hydroxydopamine on neuropeptide Y (NPY) and noradrenaline in peripheral neurons.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol 1985b; 328: 331-340.

LUNDBERG JM, RUDEHILL A, SOLLEVI A, FRIED G.
Co-release of neuropeptide Y and noradrenaline from pig spleen in vivo: Importance of subcellular storage, nerve impulse frequency and pattern, feedback regulation and resupply by axonal transport.
Neuroscience 1989; 28: 475-486.

LUTS A, SUNDLER A.
Peptide-containing nerve fibers in the respiratory tract of the ferret.
Cell Tissue Res 1989; 258: 259-267.

LYNCH DR, SNYDER SH.
Neuropeptides: multiple molecular forms, metabolic pathways and receptors.
In: *Annual Review of Biochemistry*. CC Richardson, PD Boyer, IB David, A Meister (eds)
Annual Reviews, Inc. Palo Alto, CA, 1986 pp 773-779.

MABE Y, PEREZ R, TATEMOTO K, HUIDIBRO-TORO JP.
Chemical sympathectomy reveals pre- and postsynaptic effects of neuropeptide Y (NPY) in the cardiovascular system.
Experientia 1987; 43: 1018-1020.

MACCARRONE C, JARROTT R.
Differential effects of surgical sympathectomy on rat heart concentrations of neuropeptide Y-immunoreactivity and noradrenaline.
J Auton Nerv Syst 1987; 21: 101-107.

MACE SE, LEVY MN.
Neural control of the heart rate: a comparison between puppies and adult animals.
Pediatr Res 1983; 17: 491-495.

MAENO H, KIYAMA H, TOHYAMA M.
Distribution of the substance P receptor (NK-1 receptor) in the Central Nervous System.
Mol Brain Res 1993; 18: 43-58.

MAGISTRETTI PJ, DIETL MM, HOF PP, MARTIN JL, PALACIOS JM, SCHAAD N, SCHORDERET M.

Vasoactive intestinal peptide as a mediator of intercellular communication in the cerebral cortex.
Ann NY Acad Sci 1988; 527: 110-129.

MAISEL AS, SCOTT NA, MOTULSKY HJ, MICHEL MC, BOUBLIK JH, RIVIER JE, ZIEGLER M, ALLEN RS, BROWN MR.

Elevation of plasma neuropeptide Y levels in congestive heart failure.
Am J Med 1989; 86: 43-48.

MANNON PJ, TAYLOR IL.

Gastrointestinal Peptides.
Curr Gastroenterol 1992; 12: 180-181.

MASON T, PHIFER R, SPICER SS, SWALLOW RA, DRESKIN RB.

An immunoglobulin-enzyme bridge method for localizing tissue antigens.
J Histochem Cytochem 1969; 17: 563-569.

MICHEL MC, WIRTH SC, ZERKOWSKI HR, MAISEL AS, MOTULSKY HJ.

Lack of inotropic effects of NPY in human myocardium.
J Cardiovasc Pharmacol 1989; 14: 919-922.

MILNER P, RALEVIC V, HOPWOOD AM, FEHÉR E, LINCOLN S, KIRKPATRICK KA, BURNSTOCK G.

Ultrastructural localisation of substance P and choline acetyltransferase in endothelial cells of rat coronary artery and release of substance P and acetylcholine during hypoxia.
Experientia 1989; 45: 121-125.

MINTH CD, BLOOM SR, POLAK JM, DIXON JE.

Cloning, Characterization, and DNA sequence of a human cDNA encoding neuropeptide tyrosine.
Proc Natl Acad Sci 1984; 81: 4577-4581.

MIZERES NJ.

The cardiac plexus in man.
Am J Anat 1963; 112: 142-151.

MOORE TC.

Neurovascular immunology: a 25-year odyssey.
Ann NY Acad Sci 1992; 650: 30-39.

MORRIS JL, MURPHY R, FURNESS JB, COSTA M.

Partial depletion of NPY from noradrenergic perivascular and cardiac axons by 6-hydroxydopamine and reserpine.
Regul Pept 1986; 13: 147-162.

MURAI M, MORIMOTO H, MAEDA Y, FUJII T.

Effects of the tripeptide substance P antagonist, FR 113680, on airway constriction and airway edema induced by neurokinins in guinea-pigs.
Eur J Pharmacol 1992; 217: 23-29.

MULSHOF SCJ, DIJKSTRA G, VANDER BEEK EM, BEVERS MM, FIGUEIREDO JR, BECKERS JF, VANDEN HURK R.

Immunocytochemical localization of VIP and NPY in the bovine ovary.
Biol Reprod 1994; 50: 553-560.

MUTT V, HÖKFELT T, FUXE K, LUNDBERG JM.

Neuropeptide Y.
Raven Press, New York, Karolinska Institute Nobel Conference Series, 1989.

NILSSON A.

The structure of the vasoactive intestinal octacosapeptide from chicken intestine. The amino acid sequence.
FEBS Lett 1975; 60: 322-327.

NONIDEZ JF.

Identification of the receptor areas in the venae cavae and pulmonary veins which initiate reflex cardiac acceleration.
Am J Anat 1937; 61: 203-223.

OKUMURA K, YASUE H, ISHIZAKA H, OGAWA H, FUJII H, YOSHIMURA M.

Endothelium-dependant dilator response to substance P in patients with coronary spastic angina.
JACC 1992; 20: 838-844.

ORREGO B.

Criteria for the identification of central neurotransmitters and their application to studies with some nerve tissue preparations in vitro.
Neuroscience 1979; 4: 1037-1057.

ORTS LLORCA F.

Anatomía Humana.
Ed. Científico Médica, Barcelona, 1985.

O'SHAUGHNESSY DJ, McGREGOR GP, MINA S, GHATEI MA, GU J, POLAK JM, BLOOM SR.

Regulatory peptides in the skin.
Soc Endocrinol 1981; 164th Meeting p.26.

OTTESEN B.

Vasoactive intestinal polypeptide as a neurotransmitter in the female genital tract.
Am J Obstet Gynecol 1983; 147: 208-224.

PALACIN FORGUE A.

Técnicas inmunohistoquímicas. Aspectos teórico-prácticos.
ATOM S.A., Barcelona, 1984 pp.1-44.

PAPKA RE, FURNESS JB, DELLA NG, COSTA M.

Depletion by capsaicin of substance P-immunoreactivity and acetylcholinesterase activity from nerve fibers in the guinea-pig heart.
Neurosci Lett 1981; 27: 47-54.

PAPKA RE, URBAN L.

Distribution, origin and sensitivity to capsaicin of primary afferent substance P-immunoreactive nerves in the heart.
Acta Physiol Hungarica 1987; 69: 459-468.

PAYAN DG, GOETZL EJ.

Dual roles of substance P: Modulator of immune and neuroendocrine functions.
Ann NY Acad Sci 1987; 512: 465-475.

PAYAN DG.

Neuropeptides and inflammation: The role of substance P.
Annu Rev Med 1989; 40: 341-352.

PELLETIER G, STEINBUSCH HW, VERHOFSTAD A.

Immunoreactive substance P and serotonin present in the same dense core vesicles.
Nature 1981; 293: 71-72.

PENG JH, KIMURA H, McGEER PL, McGEER EG.

Anticholine acetyltransferase fragments antigen binding (Fab) for immunohistochemistry.
Neurosci Lett 1981; 21: 281-285.

PERNOW B.

Studies on substance P. Purification, occurrence and biological actions.
Acta Physiol Scand 1953; 29 (Suppl 105): 1-90.

PERNOW J.

Substance P.

Pharmacol Rev 1983; 35:85-141.

PERNOW J.

Co-release and functional interactions of neuropeptide Y and noradrenaline in peripheral sympathetic vascular control.

Acta Physiol Scand 1988; 131 (Suppl 568): 1-56.

PERNOW J, LUNDBERG JM.

NPY induces potent contraction of arterial vascularsmooth muscle via an endothelium-independent mechanism.

Acta Physiol Scand 1988; 134: 157-158.

PETRAS JM, FADEN AL.

The origin of sympathetic preganglionic neurons in the dog.

Brain Research 1978; 144: 353-357.

PIERCEY MF, DOBRY PJK, EINSPAHR FJ, SCHROEDER LA, MASIQUES N. Use of

substance P fragments to differentiate substance P receptors of different tissues.

Regul Pept 1982; 3: 337-349.

POLAK JM, GU J, MINA S, BLOOM SR.

VIPergic nerves in the penis.

Lancet 1981; 217-219.

POLAK JM, VAN NOORDEN S (eds).

Immunocytochemistry. Practical applications in Pathology and Biology.

Wright PSG: Boston, 1983.

PORTER CC, TOTARO JA, STONE CA.

Effect of 6-hydroxydopamine and some other compounds on the concentration of norepinephrine in the hearts of mice.

J Pharmacol Exp Ther 1963; 140: 308-316.

POTTER EK.

Prolonged non-adrenergic inhibition of cardiac vagal action following sympathetic stimulation: neuromodulation by neuropeptide Y?

Neurosci Lett 1985; 54: 117-121.

PRADOS FRUTOS JC.

Desarrollo de la innervación parasimpática del corazón.
Tesis Doctoral, 1987.

PRADOS FRUTOS JC, PEÑA AL, PUERTA J, PEI-MING R.

Application of monoclonal antibodies to the study of the cardiac innervation development.
Eur Heart J 1987; 812: 114.

PRADOS JC, MARTIN PEREZ E, POLO GOMEZ E, VAZQUEZ MT, PUERTA J.

Inervación peptidérgica (SP y VIP) del sistema cardionector. Implicaciones funcionales.
V Congreso Latino de Cardiología Pediátrica. Badajoz, 2-5 Octubre 1992.

PRADOS FRUTOS JC, MARTIN PEREZ E, PUERTA FONOLLA J.

Peptidergic nerve fibers in the cardiovascular system of the rat heart.
75ème Congrès de l'Association des Anatomistes. Lille (Paris), 12-14 Mayo, 1993.

PRIETO D, BENEDITO S, RODRIGO J, MARTINEZ-MURILLO R, GARCIA SACRISTAN A.

Distribution and density of neuropeptide Y-immunoreactive nerve fibers and cells in the horse urinary bladder.
J Auton Nervous System 1989; 27: 173-180.

PURJERANTA M, RECHARDT L, PELTO-HUIKKO M, KYÖSOLA K.

Light and electron microscopic demonstration of neuropeptide Y-like immunoreactive nerves in human cardiac muscle.
Virchows Arch A, 1986; 410: 147-151.

QUARTU M, POLAK JM, DEL FIACCO M.

Neuropeptides in the human celiac/superior mesenteric ganglionic complex: An immunohistochemical study.
J Chemical Neuroanatomy 1993; 6: 79-99.

RECHARDT L, AALTO-SETÄLÄ K, PURJERANTA M, PELTO-HUIKKO M, KYÖSOLA K.

Peptidergic innervation of human atrial myocardium: an electron microscopical and immunocytochemical study.
J Auton Nerv Syst 1986; 17: 21-32.

REGOLI D, CADIEUX A, D'ORLEANS-JUSTE P.

Vasoactive peptides and their receptors. Conn (ed).
In: Methods in Neurosciences. Receptors. 1993, Academic Press, Inc pp: 43-86.

REICHELT KL, EDMINSON PD.

Peptides containing probable transmitter candidates in the Central Nervous System.
In: Peptides in Neurobiology (ed. H. Gainer), Nueva York, Plenum, 1977, pp. 171-181.

REINECKE M, WEIHE E, FORSSMANN WG.

Substance P-immunoreactive nerve fibers in the heart.
Neurosci Lett 1980; 20: 265-269.

REINECKE M, FORSSMANN WG.

Regulatory peptides (SP, NT, VIP, PHI, ENK) of autonomic nerves in the pig-heart.
Clin Exp Theory Pract 1984; A6: 1867-1871.

RIGEL DF.

Effects of neuropeptides on heart rate in dogs: comparison of VIP, PHI, NPY, CGRP and NT.
Am J Physiol 1988; 255: H311-H317.

RIGEL DF, GRUPP IL, BALASUBRAMANIAM A, GRUPP G.

Contractile effects of cardiac neuropeptides in isolated canine atrial and ventricular muscles.
Am J Physiol 1989; 257: H1082-H1087.

RIGEL DF, LATHROP DA.

VIP facilitates atrioventricular nodal conduction and shortens atrial and ventricular refractory periods in conscious and anaesthetised dogs.
Circ Res 1990; 67: 1323-1333.

RIGEL DF, LATHROP DA.

Vasoactive intestinal polypeptide enhances automaticity of supraventricular pacemakers in anesthetized dogs.
Am J Physiol 1991; 261: H463-H468.

RIOUX F, BACHELARD H, MARTEL JC, St-PIERRE S.

The vasoconstrictor effect of neuropeptide Y and related peptides in the guinea-pig isolated heart.
Peptides 1986; 7: 27-31.

RODRIGUEZ-MARTINEZ H.

Nerves Immunoreactive to vasoactive intestinal polypeptide in the porcine female genital tract.
Acta Anat 1990; 139: 287-291.

ROSAI J.

Ackerman's Surgical Pathology.
Seventh Edition, 1989.

ROSTÉNE WH.

Neurobiological and neuroendocrine functions of the vasoactive intestinal peptide (VIP).
Prog Neurobiol 1984; 22: 103-129.

SAID SI, MUTT V.

Polypeptide with broad biological activity: Isolation from small intestine.
Science 1970; 169: 1217-1218.

SAID SI, ROSENBERG RN.

Vasoactive intestinal polypeptide: Abundant immunoreactivity cell lines and normal nervous tissue.
Science 1976; 192: 907-908.

SAID SI.

Vasoactive intestinal peptide (VIP) and the lung.
In: SR Bloom, JM Polak, E Lindenlanb (eds) Systemic role of regulatory peptides. Schattauer Verlag: Stuttgart, 1982 pp.293-300.

SAID SI.

Neuropeptides in Cardiovascular Regulation.
In: Brain Peptides and Catecholamines in Cardiovascular Regulation. Ed. Joseph P. Buckley and Carlos M. Ferrario. Raven Press, New York 1987 pp 93-107.

SATA T, LINDEN J, LIU LW, KUBOTA E, SAID SI.

VIP evokes endothelium-dependent relaxation and cyclic AMP accumulation in rat aorta.
Peptides 1988; 9: 853-858.

SCHULTZBERG M, HÖKFELT T, NILSSON G, TERENIUS L, REHFELD JF, BROWN M, ELDE R, GOLDSTEIN M, SAID S.

Distribution of peptide- and catecholamine- containing neurons in the gastrointestinal tract of rat and guinea-pig: Immunohistochemical studies with antisera to substance P, vasoactive intestinal polypeptide, enkephalins, somatostatin, gastrin/cholecystokinin, neurotensin and dopamine- β -hydroxylase.
Neuroscience 1980; 5: 689-744.

SCHWARTZ JH.

Chemical Messengers: Small Molecules and peptides.
In: ER Kandel and JH Schwartz (eds). Principles of Neural Science. Second Edition. Elsevier Science Publishing Co.; Inc.: New York, 1985, pp.148-158.

SHIGERI Y, FUJIMOTO M.

Y2 receptors for NPY are coupled to three intracellular signal transduction pathways in a human neuroblastoma cell line.

J Biol Chem 1994; 269: 8842-8848.

SMITH DC, PRIOLA DV, BLOMQUIST TM.

Substance P modulates autonomic nerve activity in canine hearts.

Am J Physiol 1992; 262: H1663-H1668.

SMITHERMAN TC, DEHMER GJ.

Vasoactive intestinal peptide as a coronary vasodilator.

Am NY Acad Sci 1988; 527: 421-430.

STANOVNIK L, LOGENDER-MLINSEK M, ERJAVEC F.

The effect of compound 48/80, substance P and pentagastrin on the isolated guinea-pig atrium.

Agents Actions 1986; 18: 197-200.

STERNINI C, BRECHA N.

Distribution and colocalization of neuropeptide Y- and tyrosine hydroxylase-like immunoreactivity in the guinea-pig heart.

Cell Tissue Res 1985; 241: 93-102.

STEWART JM, GETTO CJ, NELDNER K, REEVE EB, KRIVOY WA, ZIMMERMANN E.

Substance P and analgesia.

Nature (Lond) 1976; 262: 784-785.

STUDER RO, TRZECIAK H, LERGIER W.

Isolierung und Aminosäuresequenz von substanz P aus Pferdedarm.

Helv Chim Acta 1973; 56: 860-866.

SUNDLER F, EKBLAD E, GRUNDITZ T, HAKANSON R, UDDMAN R. Vasoactive Intestinal Peptide in the peripheral nervous system.

Ann NY Acad Sci 1988; 527: 143-167.

SYKES RM, SPYER KM, IZZO PN.

Central distribution of SP, CGRP and 5 hydroxytryptamine in vagal sensory afferents in the rat dorsal medulla.

Neuroscience 1994; 59: 195-200.

TALMAN WT, KELKAR P.

Neural control of the heart. Central and Peripheral.

In: Brillman J (ed). Neurocardiology. Neurologic Clinics. Philadelphia, WB. Saunders Company 1993; 11: 239-256.

TATEMOTO K.

Neuropeptide Y: complete aminoacid sequence of the brain peptide.
Proc Natl Acad Sci USA 1982a; 79: 5485-5489.

TATEMOTO K, CARLQUIST M, MUTT V.

Neuropeptide Y - a novel brain peptide with structural similarities for peptide YY and pancreatic polypeptide.
Nature (Lond) 1982b; 296: 659-660.

TAY SSW, WONG WC.

Immunohistochemical localisation of substance P-like nerves in the cardiac ganglia of the monkey (*Macaca fascicularis*).
J Anat 1992; 180: 239-245.

THILANDER G, RODRIGUEZ-MARTINEZ H.

Fine structure of the porcine myometrium during the oestrous cycle.
Acta Anat 1989; 134: 160-170.

THOENEN H, TRANZER JP.

Chemical sympathectomy by selective destruction of adrenergic nerve endings with 6-hydroxydopamine.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmak u exp Path 1968; 261: 271-288.

TREGEAR G, NIALL HD, POTTS JT, LEEMAN SE, CHANG MM.

Synthesis of substance P.
Nature New Biol 1971; 232: 87-89.

TSUTSUMI Y, HARA M.

Peptidergic nerve fibers in human stomach and duodenal bulb: immunohistochemical demonstration of changes in fiber distribution in chronic gastritis.
Biomedical Research 1989; 10: 209-216.

UCHIDA M, YANO S, WATANABE K.

Involvement of CGRP, Substance P and blood circulation in aggravating mechanism of absolute ethanol-induced antral lesions by capsaicin treatment in rats.
Japan J Pharmacol 1993; 62: 123-129.

UDDMAN R, EKBLAD E, EDVINSSON L, HAKANSON R, SUNDLER F.

Neuropeptide-like immunoreactivity in perivascular nerve fibers of the guinea-pig.
Regul Peptides 1985; 10: 243-257.

ULLMAN B, JENSEN-URSTAD M, HULTING J, LUNDBERG JM.

Neuropeptide Y, noradrenaline and invasive haemodynamic data in mild to moderate chronic congestive heart failure.

Clinical Physiology 1993; 13: 409-418.

UNGER WG, BUTLER JM, COLE DR, McGREGOR GP, BLOOM SR.

Substance P, vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and somatostatin levels in ocular tissue of normal and sensorily denervated rabbit eye.

Exp Eye Res 1981; 32: 797-801.

URBAN L, PAPKA RE.

Origin of small primary afferent substance P-immunoreactive nerve fibers in the guinea-pig heart.

J Anat Nerv Syst 1985; 12: 321-331.

VON EULER VS, GADDUM JH.

An unidentified depressor substance in certain tissue extracts.

J Physiol (Lond) 1931; 72: 74-87.

WALSH JH, DOCRAY GJ (eds).

Gut Peptides. Biochemistry and Physiology.

Raven Press, New York, 1994.

WARNER MR, LEVY MN.

Inhibition of cardiac vagal effects by neurally released and exogenous neuropeptide Y.

Circ Res 1989a; 65: 1536-1546.

WARNER MR, LEVY MN.

Neuropeptide Y as a putative modulator of the vagal effects on heart rate.

Circ Res 1989b; 65: 882-889.

WARNER MR, LEVY MN.

Role of neuropeptide Y in neural control of the heart.

J Cardiovasc Electrophysiol 1990a; 1: 80-91.

WARNER MR, LEVY MN.

Sinus and atrioventricular nodal distribution of sympathetic fibers that contain neuropeptide Y.

Circ Res 1990b; 67: 713-721.

WATTCHOW DA, FURNESS JB, COSTA M, O'BRIEN PE, PEACOCK M.

Distribution of neuropeptides in the human esophagus.

Gastroenterology 1987; 93: 1363-1371.

WEIHE E, REINECKE M.

Peptidergic innervation of the mammalian sinus nodes: vasoactive intestinal polypeptide, neurotensin, substance P.

Neurosci Lett 1981; 26: 283-288.

WEIHE E, REINECKE M, OPHERK D, FOSSMANN WG.

Peptidergic innervation (substance P) in the human heart.

J Mol Cell Cardiol 1981; 13: 331-333.

WEIHE E, REINECKE M.

Histotopography of neuronal substance P on the heart: immunohistochemical evidence for multitarget interaction with neurotensinergic, VIP-ergic and enkephalinergic cardiac nerves.

In: Substance P: Proc Int Symposium R Skrabanek and D Powell (eds). Boole Press: Dublin, 1983 pp. 155-156.

WEIHE E, REINECKE M, FORSSMANN WG.

Distribution of vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in the mammalian heart.

Cell Tissue Res 1984; 236: 527-540.

WHARTON J, POLAK JM, McGREGOR GP, BISHOP AE, BLOOM SR.

The distribution of substance P-like immunoreactive nerves in the guinea-pig heart.

Neuroscience 1981; 11: 2193-2204.

WHARTON J, GULBENKIAN S, MERIGHI A, KUHN DM, JAHN R, TAYLOR KM, POLAK JM.

Immunohistochemical and ultrastructural localization of peptide-containing nerves and myocardial cells in the human atrial appendage.

Cell Tissue Research 1988; 254: 155-166.

WHARTON J, POLAK JM.

Neuropeptide tyrosine in the cardiovascular system.

Ann NY Acad Sci 1990a; 611: 133-144.

WHARTON J, POLAK JM, GORDON L, BANNER NR, SPRINGALL DR, ROSE M, KHAGANI A, WALLWORK J, YACOUB MH.

Immunohistochemical demonstration of human cardiac innervation before and after transplantation.

Circulation Research 1990b; 66: 900-912.

WILLIAMS PL, WARWICK R, DYSEN M, BANNISTER LH (eds).

Gray's Anatomy (37th ed)

New York: Churchill Livingstone, 1989.

YAKSH TL, ABAY EO, GO VLW.

Studies on the location and release of cholecystokinin and VIP in rat and cat spinal cord.
Brain Res 1982; 242: 279-290.

YANG T, LEVY MN.

Sequence of excitation as a factor in sympathetic-parasympathetic interactions in the heart.
Circul Res 1992; 71: 898-905.

YONEI Y, HOLZER P, GUTH PH.

Laparotomy-induced gastric protection against ethanol injury is mediated by capsaicin-sensitive sensory neurons.

Gastroenterology 1990; 99: 3-9.

ZHU W, DEY RD.

Distribution of the neuropeptide Galanin in the cat heart and coexistence with vasoactive intestinal peptide, substance P and neuropeptide Y.

J Moll Cell Cardiol 1992; 24: 35-41.