



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**DISTRIBUCIÓN DE SUSTANCIA P Y METIONINA-  
ENCEFALINA EN EL TRONCO DEL ENCÉFALO DE LA  
ALPACA (*Lama pacos*): ESTUDIO  
INMUNOCITOQUÍMICO  
TRABAJO DE GRADO DE MÁSTER**

**ELIANA DE SOUZA FREITAS**

**Salamanca, Junio 2009**

**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA**

**INSTITUTO DE NEUROCIENCIAS DE CASTILLA Y  
LEÓN (INCYL)**

**TRABAJO DE GRADO DE MÁSTER**

**ELIANA DE SOUZA FREITAS**

**Salamanca, Junio 2009**

**Rafael Coveñas Rodríguez, Profesor titular de Biología Celular de la Universidad de Salamanca**

**CERTIFICA que:**

**El trabajo titulado DISTRIBUCIÓN DE SUSTANCIA P Y METIONINA-ENCEFALINA EN EL TRONCO DEL ENCÉFALO DE LA ALPACA (*Lama pacos*): ESTUDIO INMUNOCITOQUÍMICO ha sido realizado por D<sup>a</sup>. Eliana de Souza Freitas en el Instituto de Neurociencias de Castilla y León bajo mi dirección, y en mi opinión reúne los requisitos necesarios para ser defendido y optar al grado de fin de Máster.**

**Para que así conste lo firmo en Salamanca 9 de Junio de 2009**

**Fdo. Rafael Coveñas Rodríguez**

# CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
1.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE LAMA PACOS.....	5
1.2 TRONCO DEL ENCÉFALO .....	6
1.3 NEUROPEPTIDOS .....	6
1.3.1 Familias de neuropéptidos .....	6
1.4 NEUROPEPTIDOS ESTUDIADOS EN EL TRONCO DEL ENCÉFALO DE LA ALPACA .....	7
1.4.1 SUSTANCIA P .....	7
1.4.2 Metionina-Encefalina.....	7
<b>II. JUSTIFICACION Y OBJETIVO DEL TRABAJO .....</b>	<b>8</b>
<b>III. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
3.1 ANIMALES Y PERFUSIÓN.....	10
3.2 INMUNOCITOQUÍMICA .....	11
3.3 OBTENCIÓN Y ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS .....	12
3.4 CARTOGRAFÍA.....	12
3.5 DENSIDADES DE LAS FIBRAS Y DE LOS SOMAS INMUNORREACTIVOS .....	13
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>14</b>
4.1 DISTRIBUCIÓN DE METIONINA-ENCEFALINA EN EL TRONCO DEL ENCÉFALO DE LAMA PACOS .....	14
LA PRESENCIA DE FIBRAS INMUNORREACTIVAS CON METIONINA-ENCEFALINA O CON SUSTANCIA P EN EL NÚCLEO MARGINAL DEL BRACHIUM CONJUNCTIVUM, INDICA QUE AMBOS NEUROPEPTIDOS PODRÍAN ESTAR INVOLUCRADOS IN MECANISMOS RESPIRATORIOS, MIENTRAS QUE LA PRESENCIA DE ESTRUCTURAS INMUNORREACTIVAS CON LOS DOS NEUROPEPTIDOS EN LA SUSTANCIA GRIS PERIACUEDUCTAL Y EN EL NÚCLEO ESPINAL DEL TRIGÉMINO INDICA QUE PUEDEN ESTAR INVOLUCRADOS EN PROCESOS RELACIONADOS CON LA TRANSMISIÓN NOCICEPTIVA (SAITO ET AL., 2001) .....	25
<b>VI. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>26</b>

# I. INTRODUCCIÓN

## *1.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE Lama pacos*

La alpaca es un camélido sudamericano que está estrechamente emparentado con la llama y la vicuña. Es más pequeña que la llama, su lana es más larga y suave, y no se suele usar como bestia de carga. Además, se pueden encontrar ubicadas en zonas que van desde el nivel del mar hasta regiones a más de 5.000 metros sobre el nivel del mar.

La alpaca presenta dos razas: la huacaya y la suri que se diferencian por su fibra; la fibra de la huacaya es opaca, rizada y esponjosa, parecida a la lana de oveja, mientras que la fibra de la suri es lacia, sedosa, lustrosa y brillante, parecida a la suavidad del cashmere y al lustre y brillo de la seda.

La alpaca presenta características anatómicas entre las que se destaca una silueta curva y pequeña en comparación con especies como la llama, además presenta un mechón blanco que le caracteriza. Presenta muchas tonalidades, por lo que no existe un color característico. Este animal puede alcanzar una altura hasta de 1,5 metros y un peso entre 60-80 Kg. Es un animal forrajero y su característico labio leporino le ayuda a ser más eficaz en su alimentación. La alpaca es un animal muy social y se acoplan fácilmente a vivir en rebaños, que generalmente están conformados por un macho dominante y varias hembras. La gestación en estos animales dura unos once meses y paren una sola cría.

## ***1.2 TRONCO DEL ENCÉFALO***

El tronco del encéfalo se divide desde regiones más caudales a regiones más rostrales en tres partes: bulbo raquídeo (médula oblonga o mielencéfalo), la protuberancia (metencéfalo) y el mesencéfalo. Recibe aferencias somáticas y viscerales; y también emite eferencias motoras. Está involucrado en el sueño, la vigilia, mecanismos cardiovasculares, analgesia, nocicepción, mecanismos auditivos y visuales (ver Coveñas et al., 2007a).

Además, gran parte de los doce pares craneales que inervan la cabeza, el cuello y los órganos sensoriales y que llevan información sensorial y motora están conectados anatómicamente con el tronco del encéfalo.

## ***1.3 NEUROPEPTIDOS***

Un neuropéptido es un péptido (formado por aminoácidos) que es sintetizado en una célula nerviosa (neurona). Aparecen tanto en las neuronas del sistema nervioso central (encéfalo y médula espinal), como en las del sistema nervioso periférico (ganglios espinales, sensitivos y autónomos) (Coveñas et al., 2007a). Pueden actuar como neurotransmisores, neuromoduladores y/o neurohormonas, (ver Coveñas et al., 2007a; Mangas et al., 2007).

### ***1.3.1 Familias de neuropéptidos***

Actualmente, los péptidos se clasifican dependiendo de las semejanzas/diferencias (homología) de las secuencias de aminoácidos que presentan. Aproximadamente, hay

unos 600 péptidos descritos. Los neuropéptidos se agrupan en familias dependiendo de las homologías de las cadenas que las componen (ver Coveñas et al., 2007a).

Los neuropéptidos se encuentran ampliamente distribuidos por el sistema nervioso periférico y central de mamíferos. Por ejemplo, para conocer la distribución de los neuropéptidos en los núcleos del sistema nervioso central de la rata, ver Palkovits (1988), mientras que para conocer la distribución de los neuropéptidos en el tálamo, hipotálamo y en el tronco del encéfalo del gato, ver las revisiones realizadas por Coveñas et al. (2001, 2002, 2007c).

## ***1.4 NEUROPEPTIDOS ESTUDIADOS EN EL TRONCO DEL ENCÉFALO DE LA ALPACA***

### ***1.4.1 Sustancia P***

La sustancia P (SP) es un neuropéptido de once aminoácidos (Hoyle, 1996; Stahl, 1999). La SP estimula la contracción del músculo liso, además de estar involucrado en mecanismos de salivación (Felipe. et al., 1998). Igualmente, se han publicado estudios que demuestran que la SP, a altas concentraciones, aumenta la liberación de metaloproteinasas (principalmente MMP-1, 3 y 11) y a bajas concentraciones, disminuye los niveles de metaloproteinasas, tiene efecto vasodilatador potente y aumenta la permeabilidad vascular en los procesos inflamatorios (Moussaoui, 1992).

### ***1.4.2 Metionina-Encefalina***

Es un pentapéptido involucrado en la regulación del dolor (Pittius et al., 1984). Mediante la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas y de radioinmunoensayo, se ha estudiado la distribución de metionina-enkefalina en el sistema nervioso central de la rata, gato, mono y hombre (Pittius et al., 1984; Zamir et al., 1983; Fallon y Leslie, 1986; Murakami et al., 1987; Ibuki, et al., 1989; Belda et al., 2003; Aguilar et al., 2004; Coveñas et al., 2004, 2008).

Es la primera vez que se realiza un estudio detallado sobre la distribución de somas y fibras marcadas con metionina-enkefalina/sustancia P, en el tronco del encéfalo de la alpaca, tras aplicar una técnica inmunocitoquímica.

## **II. JUSTIFICACION Y OBJETIVO DEL TRABAJO**

Nuestro grupo de investigación ha venido realizando desde 1983 investigaciones sobre la distribución de neuropéptidos en el sistema nervioso central de mamíferos, mediante la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas. Hasta hoy hemos descrito en el sistema nervioso central de mamíferos la distribución de fibras y somas que contienen neuropéptidos pertenecientes a numerosas familias de neuropéptidos (péptido liberador de gastrina, colecistoquinina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina, neuropéptido Y, neurotensina, oxitocina, somatostatina, taquiquinas (neuroquinina A, sustancia P), opiáceos (metionina-enkefalina, alfa-neo-endorfina, beta-endorfina, dinorfina A), hormona adrenocorticotrópica, hormona estimulante de los melanocitos, galanina, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factor



liberador de corticotropina...). Estos estudios fueron realizados en rata, cobaya, gato, perro, mono y hombre. Estos trabajos han aportado, principalmente, datos pioneros sobre la presencia de fibras y somas con neuropéptidos en el sistema nervioso central de mamíferos en general y/o en una determinada especie en particular (de León et al., 1992; Marcos et al., 1993; Coveñas et al., 1997, 1999, 2001, 2002, 2003, 2004, 2007a, b, c; Pego-Reigosa et al., 2000; Belda et al., 2003; Pesini et al., 2004). Entre otras aplicaciones, estos trabajos abren la puerta a los fisiólogos, para que estudien en determinadas zonas del sistema nervioso central las acciones que puedan ejercer los neuropéptidos.

A la lista de las seis especies, en las que hemos estudiado la distribución de numerosos neuropéptidos, añadimos en este trabajo, los estudios que hemos realizado en una nueva especie: la alpaca. Recientemente hemos publicado un estudio sobre la distribución de somas y fibras marcadas con el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y leucina-encefalina en el tronco del encéfalo de la alpaca, tras aplicar una técnica de inmunocitoquímica (de Souza et al 2007, 2008). Es importante resaltar que de este animal solo se conocía estudios sobre la función reproductiva (Bravo et al., 1996; Correa et al., 1997; Ratto et al., 1997, 2005, 2006). Este trabajo es parte de la línea que se viene desarrollando sobre la distribución de neuropéptidos en el sistema nervioso central de la alpaca, y se centra en el estudio de la distribución de somas y fibras inmunomarcadas con metionina-encefalina y sustancia P en el tronco del encéfalo de esta especie. La obtención de los encéfalos de dichos animales ha sido posible gracias a la colaboración científica de la universidad peruana “Cayetano Heredia” (Lima-Perú). En el futuro, obtendremos más resultados sobre la distribución de somas y fibras marcados con otros neuropéptidos (neurotensina, somatostatina-28 (1-12), beta-endorfina (1-12), hormona adrenocorticotrópica (18-39), hormona

estimulante de los melanocitos, alfa-neo-endorfina), en diferentes zonas del sistema nervioso central de la alpaca

## **III. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **3.1 Animales y perfusión**

Hemos utilizado cuatro alpacas (raza huacaya) machos adultos (*Lama pacos*) (70-80 kg) suministrados por la Facultad de Veterinaria de la Universidad Cayetano Heredia (Lima, Perú). Los animales fueron mantenidos (altitud: 0 m sobre el nivel del mar durante toda su vida) en condiciones estándar de luz, temperatura y alimentación (acceso libre al alimento y agua). Los animales, una vez anestesiados profundamente con ketamina (10 mg/kg) y xilacina (4 mg/kg) (ambos suministrados por vía intravenosa), fueron perfundidos a través de la carótida con 3 l de solución salina (0,9%) seguido de 5 l de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato salino (PBS) (pH 7,2). A continuación, los encéfalos fueron extraídos y los troncos del encéfalo diseccionados. La postfijación se realizó durante doce horas en el mismo fijador indicado anteriormente. Posteriormente, los troncos del encéfalo se colocaron en soluciones crecientes de sacarosa (desde el 10% al 30%) con la finalidad de crioprotegerlos. Más tarde secciones transversales seriadas de 50 µm de grosor del tronco del encéfalo fueron obtenidas en un criostato y almacenadas a 4° C en PBS. Finalmente, a las secciones se les aplicó una técnica inmunocitoquímica o la técnica del violeta de cresilo (Mangas et al., 2004, 2006).

### 3.2 Inmunocitoquímica

A las secciones obtenidas le aplicamos la técnica inmunocitoquímica del ABC.

1. Las secciones fueron introducidas en una solución de agua oxigena y metanol, durante 20 min (reposo y oscuridad)
2. Las secciones fueron lavadas durante 20 min en PBS (agitación)
3. Preincubación de las secciones en PBS que contiene un 1% de suero normal de caballo y 0,3% de Triton X-100 (mezcla) durante 30 min (agitación)
4. Incubación en el primer anticuerpo (anti-sustancia P y anti-metionina-encefalina) diluido 1/3.500 en la mezcla del paso tres durante 16 h a 4° C (reposo)
5. Lavado de las secciones en la mezcla durante 30 min (agitación)
6. Incubación durante 60 min en un anticuerpo biotinilado anti-conejo diluido 1/200 en la mezcla (agitación)
7. Lavado de 30 min en la mezcla (agitación)
8. Las secciones se incubaron durante 60 min (agitación) en la mezcla que contiene el complejo avidina-biotina, unido a peroxidasa (ABC) diluido 1/100
9. Las secciones fueron lavadas en la mezcla, durante 30 min (agitación)
10. Las secciones fueron lavadas en Tris-ClH (pH 7,6), durante 10 min (reposo)
11. Se realizó el revelado de la peroxidasa con agua oxigenada y con el cromógeno 3,3'- diaminobenzidina (disuelto en Tris-ClH), durante 5-10 min en reposo y en oscuridad.
12. Finalmente, las secciones fueron montadas en portas y cubiertas con una solución de montaje (glicerol: PBS, 1/1), tras lo cual se colocó el cubre.

### **3.3 Obtención y especificidad de los anticuerpos**

Los anticuerpos primarios policlonales utilizados en este estudio (anti-sustancia P y metionina-enkefalina) se obtuvieron en conejo. Ambos anticuerpos se dirigieron contra sus inmunógenos respectivos, que se prepararon acoplado la molécula peptídica sintética completa a una proteína transportadora (seroalbúmina humana) con glutaraldehído. Los conejos se inmunizaron inicialmente con estos inmunógenos emulsionados con adyuvante de Freund completo. Se administraron dosis de recuerdo con adyuvante de Freund incompleto a intervalos de dos semanas. El plasma se extrajo de los conejos 10 días después de tres dosis de recuerdo y, luego, periódicamente (Marcos et al., 1999).

La especificidad de los anticuerpos primarios se ha demostrado previamente (Marcos et al., 1999). Indicamos los controles realizados para confirmar la especificidad de la inmunorreactividad observada:

1. Sustitución del primer anticuerpo por mezcla
2. Preabsorción del primer anticuerpo con el péptido sintético correspondiente (100 µg/ml de anticuerpo diluido) (ej., anti metionina-enkefalina con metionina-enkefalina)
3. Preabsorción del primer anticuerpo con otros péptidos ( $10^{-7}$  M) (ej., anti-metionina-enkefalina con leucina-enkefalina, beta-endorfina...; anti-sustancia P con neuroquinina A, neuroquinina B...)

En todos los casos, los controles realizados confirmaron la especificidad de los anticuerpos utilizados en este estudio (Marcos et al., 1999).

### **3.4 Cartografía**

La cartografía ha sido realizada según las secciones del tronco del encéfalo de la alpaca teñidas con violeta de cresilo. Secciones consecutivas a aquellas a las que le aplicamos la técnica inmunocitoquímica fueron teñidas con el mencionado colorante. Además, los distintos centros del tronco del encéfalo de la alpaca fueron localizados principalmente con la ayuda del atlas del sistema nervioso central de *Lama glama* (Llama) (obtenido a partir de la colección de cerebros de mamíferos de la Universidad de Wisconsin, Madison, USA), aunque también utilizamos otros atlas de mamíferos no-camélidos (rata, gato) (Berman, 1968; Paxinos y Watson, 1998). Para la nomenclatura de los núcleos del tronco del encéfalo de la alpaca, seguimos la utilizada en los dos atlas mencionados anteriormente.

### **3.5 Densidades de las fibras y de los somas inmunorreactivos**

La densidad de las fibras inmunorreactivas observadas se ha clasificado en cuatro categorías: alta, moderada y baja. Para determinar la densidad de dichas fibras, hemos comparado los resultados obtenidos en la alpaca con las densidades que aparecen en tres fotografías, realizadas al mismo aumento, en las que se han establecido previamente los tres grados de densidad (Coveñas et al., 1999).

Respecto a la densidad de los somas inmunorreactivos, consideramos una densidad alta cuando observamos más de 20 somas por sección; una densidad moderada, entre 10-20 somas por sección y una densidad baja cuando observamos menos de 10 somas por sección.

Las fotografías se realizaron con una cámara digital Olympus DP-50 acoplada a un microscopio Kyowa Unilux-12. Para mejorar la calidad de las imágenes, sólo se ajustaron el brillo y el contraste de estas.

## IV. RESULTADOS

### 4.1 Distribución de metionina-enkefalina en el tronco del encéfalo de *Lama pacos*

La Figura 1 muestra la distribución de estructuras inmunomarcadas para la metionina-enkefalina en el tronco del encéfalo de la alpaca.

Hemos encontrado una baja densidad de somas marcadas con este neuropéptido en la línea media bulbar (Figuras 1E; 2F), en la formación reticular bulbar (Figuras 1F, 3D) y en núcleo espinal del trigémino (Figuras 1E, 3A, B). Se ha observado una alta densidad de fibras marcadas con metionina-enkefalina en la formación reticular mesencefálica (Figura 1B), porción ventral de la sustancia gris periacueductal (Figura 1C). Además, encontramos una moderada densidad de fibras con metionina-enkefalina en el núcleo espinal del trigémino, núcleo espinal alaminar del trigémino (Figuras 1E; 3B), núcleo facial (división lateral y división medial) (Figura 1F), alrededor del brachium conjunctivum (Figura 1E), así como también podemos observar una moderada densidad de fibras marcada con este neuropéptido en el núcleo interpeduncular (Figuras 1A; 2B,C), sustancia gris periacueductal (Figuras 1A, C; 2D, E), sustancia negra (Figura 1A), cuerpo trapezoide (Figura 1E), núcleo reticular tegmental, núcleo gracilis (Figura 1G) y genu del nervio facial (Figura 1F).

Además, una densidad baja de fibras con metionina-enkefalina fue observada en el núcleo motor del trigémino (Figura 1E), en la porción dorsal de la línea media de la protuberancia y del bulbo raquídeo (Figura 1E-G), colículo superior (Figura 1A-D),

núcleo motor dorsal del vago (Figura 1F,G), núcleos cuneatus, oliva inferior, núcleo reticular lateral (Figura 1G), también encontramos en el núcleo rojo, núcleo troclear (Figura 1A, B), sustancia gris de la protuberancia (Figura 1D), núcleo hipogloso (Figuras 1F, G; 3E, F), cuerpo restiforme, núcleo vestibular y en el núcleo del tracto solitario (Figura 1F).

**Figura 1.** Distribución de fibras y/o somas neuronales con metionina-enkefalina en secciones frontales del tronco del encéfalo de la alpaca, desde regiones rostrales (A) a caudales (G). Las fibras están representadas por líneas varicosas (densidad baja), líneas continuas (densidad moderada) y líneas cruzadas (densidad alta), mientras que los somas neuronales que contienen metionina-enkefalina están representados por cuadrados (densidad baja). Para nomenclatura de los núcleos, ver tabla I.



**Figura 2.** . Somas marcados con metionina-enkefalina en la línea media bulbar (F).  
Fibras marcadas con metionina-enkefalina en la formación reticular bulbar, núcleo interpeduncular y sustancia gris periacueductal (A-E). El recuadro de la foto en B está ampliado en (C) y recuadro en (D) ampliado en (E); AQ: acueducto; D: dorsal; L: lateral; M: medial; V: ventral. Barra: 100  $\mu$ m (A-F).

**Figura 3.** Somas con metionina-encefalina en núcleo espinal del trigemino (A, B), formación reticular bulbar (D). Fibras con metionina-encefalina en la formación reticular bulbar (C) y en núcleo hipogloso (E, F). 5SL: núcleo espinal del trigémino; D: dorsal; L: lateral; V: ventral. Barra: 100  $\mu\text{m}$  (A, B, C, E, F); 50  $\mu\text{m}$  (D).

## **4.2 Distribución de sustancia P en el tronco del encéfalo de Lama pacos**

Hemos observado una densidad moderada de fibras con sustancia P en el núcleo motor del trigémino (Figura 4E), en el tracto espinal del trigémino (Figura 4E-H), sustancia gris periacueductal (Figuras 4B; 5A, E). Observamos una baja densidad de fibras en el núcleo espinal del trigémino, núcleo espinal alaminar del trigémino, división parvocelular (Figura 4F, G, H), alrededor del brachium conjunctivum (Figura 4E), junto al canal central (Figura 4H), colículo superior (Figura 4A-C), núcleo cuneatus (Figura 4G, H), núcleo dorsal del rafe (Figura 4A-D), colículo inferior (Figura 4D), oliva inferior (Figura 4G, H), núcleo interpeduncular (Figura 4A, C), núcleo reticular lateral (Figura 4H), también, en el núcleo del tracto solitario (Figuras 4G, H), núcleo rojo (Figura 4A, B), tracto piramidal (Figura 4E), sustancia gris de la protuberancia (Figura 4C, D) núcleo hiplogoso (Figura 4G; 5F), cuerpo restiforme (Figura 4F), sustancia negra (Figura 4A), oliva superior (Figura 4E), formación reticular mesencefálica, de la protuberancia y del bulbo (Figura 4A-H; 5B, C), cuerpo trapezoide (Figura 4E) y núcleos vestibulares (Figura 4F).

**Figura 4.** Distribución de las fibras con sustancia P en secciones frontales del tronco del encéfalo de la alpaca, desde regiones rostrales (A) a caudales (H). Las fibras están representadas por líneas varicosas (densidad baja), líneas continuas (densidad moderada) y líneas cruzadas (densidad alta). Para nomenclatura de los núcleos ver, tabla 1

**Figura 5.** Fibras con sustancia P en la sustancia gris pericueductal (A,E), formación reticular (B,C), núcleo espinal del trigémino (D), núcleo hipogloso (F). AQ: acueducto; D: dorsal; L: lateral. Barra: 100  $\mu\text{m}$  (A-F).

**Tabla I.** Distribución de somas y fibras marcadas con metionina-encefalina y sustancia P en el tronco del encéfalo de la alpaca

Núcleos	Nombres de los núcleos	Metionina-encefalina		Sustancia P	
		S	F	S	F
<b>4</b>	Núcleo troclear	-	+	-	+
<b>5M</b>	Núcleo motor del trigémino	-	+	-	++
<b>5SL</b>	Núcleo espinal del trigémino	-	++	-	+
<b>5SP</b>	Núcleo espinal alaminar del trigémino, división parvocelular	-	++	-	+
<b>5ST</b>	Tracto trigémino espinal	+	-	-	++
<b>7G</b>	Genu del nervio facial	-	++	-	-
<b>7L</b>	Núcleo facial, división lateral	-	++	-	-
<b>7M</b>	Núcleo facial, división medial	-	++	-	-
<b>12</b>	Núcleo hipogloso	-	+	-	+
<b>BC</b>	Brachium conjunctivum	-	-	-	-
<b>BCL</b>	Núcleo marginal del brachium conjunctivum, división lateral	-	-	-	-
<b>BCM</b>	Núcleo marginal del brachium conjunctivum, división medial	-	-	-	+
<b>CS</b>	Colículo Superior	-	+	-	+
<b>Cu</b>	Núcleo cuneatus	-	+	-	+
<b>DMV</b>	Núcleo motor dorsal del vago	-	+	-	-
<b>DRM</b>	Núcleo dorsal de rafe	-	-	-	+
<b>FRet</b>	Formación reticular	-	+++	-	++
<b>GR</b>	Núcleo gracilis	-	++	-	-
<b>IC</b>	Colículo inferior	-	-	-	+
<b>IO</b>	Oliva inferior	-	+	-	+
<b>IP</b>	Núcleo interpeduncular	-	++	-	+
<b>LRet</b>	Núcleo reticular lateral	-	+	-	+

<b>MLB</b>	Tracto longitudinal medial	-	-	-	-
<b>NTS</b>	Núcleo del tracto solitario	-	-	-	-
<b>NR</b>	Núcleo rojo	-	+	-	+
<b>P</b>	Tracto piramidal	-	-	-	+
<b>PAG</b>	Sustancia gris periacueductal	-	++	-	++
<b>PG</b>	Sustancia gris de la protuberancia	-	-	-	+
<b>PGL</b>	Sustancia gris de la protuberancia, división lateral	-	-	-	+
<b>PGM</b>	Sustancia gris de la protuberancia, división medial	-	+	-	+
<b>PH</b>	Núcleo praepositus hypoglossi	-	-	-	-
<b>RB</b>	Cuerpo restiforme	-	+	-	+
<b>S</b>	Tracto solitario	-	+	-	+
<b>SN</b>	Sustancia negra	-	++	-	+
<b>SO</b>	Oliva superior	-	-	-	+
<b>TB</b>	Cuerpo trapezoide	-	++	-	+
<b>TRC</b>	Núcleo reticular tegmental, división central	-	++	-	-
<b>VES</b>	Núcleo vestibular	-	-	-	+

## V. DISCUSIÓN

Hemos encontramos una moderada densidad de fibras con metionina-enkefalina en el núcleo espinal del trigémino, núcleo facial (división lateral y medial), núcleo hipogloso, núcleo marginal del brachium conjunctivum, núcleo cuneatus, núcleo interpeduncular, núcleo del tracto solitario y en la sustancia negra. Estos resultados concuerdan con trabajos previos realizados por nuestro grupo en cuanto a la distribución de CGRP y de leucina-enkefalina (de Souza et. al., 2007, 2008): ambos neuropéptidos están presentes en todos los núcleos mencionados anteriormente.

Si comparamos la distribución de las fibras inmunorreactivas para la metionina-enkefalina y la sustancia P, podemos resaltar que la distribución del primer neuropéptido es mayor que la del segundo. Aunque, en general, hay una gran similitud en la distribución de las fibras con ambos neuropéptidos en el tronco del encéfalo de alpaca. Esta estrecha relación anatómica sugiere que podría haber coexistencia de ambos neuropéptidos, así como existir una implicación funcional entre los neuropéptidos estudiados en este trabajo. La presencia de somas con metionina-enkefalina y sustancia P es escasa, debido probablemente a que no se administró colchicina.

Si comparamos los resultados reseñados por Marcos, (2007), la distribución y la densidad de los somas marcados con metionina-enkefalina en el gato es mayor que la observada en nuestro estudio, pero hay que resaltar que en gato se inyectó colchicina intraventricularmente, mientras que las alpacas no recibieron dicha droga. Sin embargo, si comparamos la distribución de las fibras marcadas con metionina-



encefalina y sustancia P, en tronco del encéfalo de la alpaca, podemos afirmar que es muy similar en ambas especies (gato y alpaca).

La presencia de fibras inmunorreactivas con metionina-encefalina o con sustancia P en el núcleo marginal del brachium conjunctivum, indica que ambos neuropéptidos podrían estar involucrados in mecanismos respiratorios, mientras que la presencia de estructuras inmunorreactivas con los dos neuropéptidos en la sustancia gris periacueductal y en el núcleo espinal del trigémino indica que pueden estar involucrados en procesos relacionados con la transmisión nociceptiva (Saito et al., 2001)

Esperamos que los resultados descritos en este trabajo sobre los neuropéptidos estudiados, sirvan en el futuro para continuar el estudio sobre la distribución y funciones de los neuropéptidos en el sistema nervioso central de la alpaca, en particular, y de los camélidos en general y que también sirva para realizar estudios comparativos posteriores en cuanto a la distribución de los neuropéptidos en animales que vivieron a nivel del mar o a gran altitud.

## **VI. CONCLUSIÓN**

- 1.** Hemos descrito, por primera vez la distribución de fibras y somas inmunorreactivos con metionina-encefalina y sustancia P en el tronco del encéfalo de la alpaca.
- 2.** Hemos observado pocos somas con metionina-encefalina en el tronco del encéfalo de la alpaca. Estos fueron localizados en la línea media de la formación reticular bulbar.

Con respecto al neuropéptido de la sustancia P, no encontramos somas inmunorreactivos.

3. En general, la distribución de las fibras con metionina-enkefalina o con sustancia P en el tronco del encéfalo de la alpaca es bastante parecida.

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Aguilar, L., Malmierca M.S, Coveñas R., López-Poveda E.A, Tramú G, Merchán M **2004**, Immunocytochemical distribution of methionine-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 (Met-8) in the auditory system of the rat. *Hear. Res.*, 187: 111-121
- Belda, M., Coveñas, R., Narváez, J.A., Aguirre, J.A. y Tramu, G. **2003**, An immunocytochemical mapping of methionine-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> in the cat brainstem. *Anat. Embryol.*, 206: 399-408.
- Berman, A.L., **1968**, *The Brain Stem of the Cat. A Cytoarchitectonic Atlas with Stereotaxic Coordinates*, The University of Wisconsin Press, Madison.
- Bravo, P.W., Stewart, D.R., Lasley, B.L. y Fowler, M.E. **1996**, Hormonal indicators of pregnancy in llamas and alpacas. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 208: 2027-2030.

- Correa, J.E., Ratto, M.H., y Gatica, R. **1997**, Superovulation in llamas (*Lama glama*) with pFSH and equine chorionic gonadotrophin used individually or in combination. *Anim. Reprod. Sci.*, 46: 289-296.
- Coveñas, R., de León, M., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G. y González-Barón, **1997**, ACTH/CLIP immunoreactivity in the cat brain stem. *Peptides*, 18: 965-970.
- Coveñas, R., de León, M., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G. y González-Barón, S. **1999**, Anatomical distribution of beta-endorphin (1-27) in the cat brainstem: an immunocytochemical study. *Anat. Embryol.*, 199: 161-167.
- Coveñas, R., de León, M., Belda, M., Marcos, P., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G. y González-Barón, S. **2001**, Neuropeptides in the cat diencephalon: I. Thalamus. *Eur. J. Anat.*, 5: 159-169.
- Coveñas, R., de León, M., Belda, M., Marcos, P., Narváez, J.A., Aguirre, J.A., Tramu, G. y González-Barón, S. **2002**, Neuropeptides in the cat diencephalon: II. Hypothalamus. *Eur. J. Anat.*, 6: 47-57.
- Coveñas, R., Martín, F., Belda, M., Smith, V., Salinas, P., Rivada, E., Díaz-Cabiale, Z., Narváez, J.A., Marcos, P., Tramu, G. y González-Barón, S. **2003**, Mapping of neurokinin-like immunoreactivity in the human brainstem. *BMC Neuroscience*, 4: 3.

- Coveñas, R., Martín, F., Salinas, P., Rivada, E., Smith, V., Aguilar, L.A., Díaz-Cabiale, Z., Narváez, J.A. y Tramu, G. **2004**, An immunohistochemical mapping of methionine-enkephalin-Arg<sup>6</sup>-Gly<sup>7</sup>-Leu<sup>8</sup> in the human brainstem. *Neuroscience*, 128: 843-859.
- Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. **2007a** Introduction to neuropeptides. En: *Focus on Neuropeptide Research*. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 103-113
- Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, JA **2007b** Pathophysiology of neuropeptides. En: *Focus on Neuropeptide Research*. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 241-272
- Coveñas, R., Mangas, A., Belda, M., Díaz-Cabiale, Z. y Narváez, J.A. **2007c**, Neuropeptides in the cat diencephalon. En: *Focus on Neuropeptide Research*, Coveñas, R., Mangas, A. y Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 115-143
- Coveñas, R, Duque, E, Mangas, A, Marcos P, Narváez J.A, **2008**, Neuropeptides in the monkey ( *Macaca fascicularis*) brainstem En: *Brain Molecules: from Vitamins to Molecules for Axonal Guidance*, Mangas, A., Coveñas, R., Geffard, M. (eds.) Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 131-156

- de León, M., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A. y González-Barón, S. **1992**, Distribution of somatostatin-28 (1-12) in the cat brainstem: an immunocytochemical study. *Neuropeptides*, 21: 1-11.
- de Souza, E., Yi, P., Aguilar, LA, Coveñas R, Lerma, L, Andrade, R, Mangas, A, Narváez, A **2007** Mapping of leucine-enkephalin in the alpaca (*Lama pacos*) brainstem. En: Focus on Neuropeptide Research. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A.(eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 103-113
- de Souza E., Coveñas R, Yi P., Aguilar L.A, Lerma L, Andrade R., Mangas A., Díaz-Cabiales Z, Narváez JA **2008** Mapping of CGRP in the alpaca (*Lama pacos*) brainstem. *J. Chem. Neuroanat.*, 35:346-55
- Fallon J.H., y Leslie F.M., **1986** Distribution of dynorphin, enkephalin peptides in the rat brain. *J. Comp. Neurol.* 249: 293-336
- Hoyle C.H.V., **1996** *Neuropeptides: Essential Data*. Chichester: John Wiley & Sons.
- De Felipe C., Herrero J. F, O'Brien J.A, Palmer J.A, Doyle C.A, Smith A.J, Laird J.M, Belmonte C, Cervero F, **1998** Altered nociception, analgesia and aggression in mice lacking the receptor for substance P. *Nature*, 392:394-397
- Ibuki T., Okamura H., Miyazaki M, Yanaihara N., Zimmerman E.A, Iyata Y **1989** Comparative distribution of three opioid systems in the lower brainstem

of the monkey (*Macaca fuscata*). J Comp Neurol 279: 445-456. immunocytochemical study. Neuropeptides, 21: 1-11

- Mangas, A., Coveñas, R., Geffard, K., Geffard, M., Marcos, P., Insausti, R. y Dabadie, M.P. **2004**, Folic acid in the monkey brain: an immunocytochemical study. Neurosci. Lett., 362: 258-261
- Mangas, A., Coveñas, R., Geffard, K., Geffard, M., Marcos, P., Insausti, R. y Dabadie, M.P. **2006**, Thiamine-like in the monkey brain: an immunocytochemical study. Life Sci., 79: 1121-1128.
- Mangas, A., Coveñas, R., Narváez J.A. **2007** Functions of neuropeptides. En: Focus on Neuropeptide Research. Coveñas, R., Mangas, A., Narváez, J.A. (eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 189-217
- Marcos, P., Coveñas, R., Narváez, J.A., Tramu, G., Aguirre, J.A. y González-Barón, S. **1993**, Alpha-neo-endorphin-like immunoreactivity in the cat brain stem. Peptides, 14: 1263-1269.
- Marcos, P., Coveñas, R., Narváez, J.A., Díaz-Cabiale, Z., Aguirre, J.A., Tramu, G. y González-Barón, S., **1999**, Immunohistochemical mapping of enkephalins, NPY, CGRP and GRP in the cat amygdala. Peptides, 20: 635-644.
- Marcos, P., **2007**, Neuropeptides in the cat brainstem, Mangas, A., Coveñas, R., Geffard, M. (Eds.), Transworld Research Network, Trivandrum, pp. 57-101

- Moussaoui S.M., Le Prado N., Bonici B., Faucher D.C, Cuine F, Laduron P.M., Garret C **1992** Distribution of neurokinin B in rat spinal cord and peripheral tissues: Comparison with neurokinin A and substance P and effects on neonatal capsaicin treatment. *Neuroscience*, 4:969-978.
- Murakami S., Okamura H, Yanaihara C., Yanaihara N., Ibata Y **1987** Immunocytochemical distribution of met-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 in the rat lower brainstem. *J. Comp. Neurol.* 261:193-208.
- Palkovits, M., **1988**, *Neuropeptides in the brain*. En: *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol. 10, Martini, L. y Ganong W.F. (Eds), Raven Press, Nueva York, pp. 1-44.
- Paxinos, G., y Watson, C., **1998**, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. Academic Press, San Diego.
- Pego-Reigosa, R., Coveñas, R., Tramu, G. y Pesini, P. **2000**, Distribution of met- enkephalin immunoreactivity in the diencephalon and the brainstem of the dog. *J. Chem. Neuronanat.*, 19: 243-258.
- Pesini, P., Pego-Reigosa, R., Tramu, G. y Coveñas, R. **2004**, Distribution of ACTH immunoreactivity in the diencephalon and the brainstem of the dog. *J. Chem. Neuronanat*, 27:275-282

- Pittius, C.W., Seizinger, B.R., Pasi, A., Mehraein, P., Herz, A. **1984**  
Distribution and characterization of opioid peptides derived from proenkephalin A in human and rat central nervous system. *Brain Res.*, 304: 127-136.
- Ratto, M.H., Gatica, R. y Correa, J.E. **1997**, Timing of mating and ovarian response in llamas (*Lama glama*) treated with pFSH. *Anim. Reprod. Sci.*, 48: 325-330.
- Ratto, M.H., Huanca, W., Singh, J. y Adams, G.P. **2005**, Local versus systemic effect of ovulation-inducing factor in the seminal plasma of alpacas. *Reprod. Biol. Endocrinol.*, 3: 29.
- Ratto, M.H., Huanca, W., Singh, J. y Adams, G.P. **2006**, Comparison of the effect of natural mating, LH, and GnRH on interval to ovulation and luteal function in llamas. *Anim. Reprod. Sci.*, 91: 299-306.
- Saito Y., Ito M, Ozawa Y, Matsuishi T, Hamano K, Takashima S **2001**  
Reduced expression of neuropeptides can be related to respiratory disturbances in Rett syndrome. *Brain Develop.*, Suppl. 1: S122-S126
- Stahl S.M. **1999** Substance P and the neurokinins: novel peptide neurotransmitters in psychopharmacology. *J. Clin. Psychiatry.*, 60:77-78.
- Zamir N, Palkovits M, Brownstein MJ **1983** Distribution of immunoreactive dynorphin in the central nervous system of the rat. *Brain Res.*, 280: 81-93



