

# UNIVERSIDAD DE SALAMANCA



*Facultad de Medicina  
Departamento de Biología  
Celular y Patología*

*Instituto de Neurociencias de  
Castilla y León (INCYL).  
Laboratorio de Neuroanatomía de  
los Sistemas Peptidérgicos  
Laboratorio 14*

## DISTRIBUCIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN EL TRONCO DEL ENCÉFALO DE LA ALPACA

*(Lama pacos): ESTUDIO*

**INMUNOCITOQUÍMICO**

**ELIANA DE SOUZA FREITAS**

**Julio de 2010**



**DISTRIBUCIÓN DE NEUROPEPTIDOS EN EL TRONCO  
DEL ENCÉFALO DE LA ALPACA (*Lama pacos*): ESTUDIO  
INMUNOCITOQUÍMICO**

TRABAJO REALIZADO POR LA LICENCIADA  
**ELIANA DE SOUZA FREITAS** PARA ASPIRAR  
AL GRADO DE DOCTORA EN NEUROCIENCIAS

**SALAMANCA, Julio de 2010**

**Rafael Coveñas Rodríguez**, profesor titular de Biología Celular de la Facultad de Biología de la Universidad de Salamanca y miembro del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL)

**CERTIFICA:**

Que el trabajo titulado “*Distribución de Neuropeptidos en el Tronco del Encéfalo de la Alpaca (Lama pacos): Estudio Inmunocitoquímico*”, ha sido realizado por Doña **Eliana de Souza Freitas** en el Departamento de Biología Celular y Patología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca y en el Laboratorio de Neuroanatomía de los Sistemas Peptidérgicos del Instituto de Neurociencias de Castilla y León (Laboratorio 14, INCYL), bajo mi dirección, y considero que reúne las condiciones necesarias para ser defendido y optar al grado de doctora.

**Salamanca, Julio de 2010**

**Esta tesis está dedicada a Dios, a mi familia,  
por todo aquello que hemos superado juntos ;  
en especial a mi madre por su valor y fuerza  
con los que ha afrontado estos años.**

# AGRADECIMIENTOS

Primero y antes que nada, dar gracias a Dios, por estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

Mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas e instituciones que de una u otra forma hicieron posible este proyecto, en especial:

Al Profesor Dr. Rafael Coveñas Rodríguez, tutor de la Tesis, su esfuerzo y dedicación, sus conocimientos, sus orientaciones, su manera de trabajar, su constancia, su paciencia y su motivación han sido fundamentales para mi formación como investigadora. A su manera, ha sido capaz de ganarse mi lealtad y admiración, así como sentirme en deuda con él por todo lo recibido durante el proceso académico ¡Gracias!

Al Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL), por abrirme las puertas y brindarme las herramientas para desarrollar la tesis doctoral, especialmente a su director, Profesor Miguel Merchán.

A los profesores Luis Ángel Aguilar y Pedro Yi (*in memoriam*) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH-Lima, Perú) quienes obtuvieron los troncos de encéfalo de *Lama pacos*.

Al profesor Gérard Tramu, de la Universidad de Burdeos I, quien donó los anticuerpos primarios, para la realización de este trabajo .

Al Dr. D. Ewing R. Duque Díaz por brindarme su apoyo en los momentos que más lo necesité.

Al Dr. Arturo Mangas Martín quien impecablemente me guió en el desarrollo de las técnicas inmunocitoquímicas y fotográficas.

A todos aquellos que han hecho posible la elaboración de esta tesis, profesores, amigos, familiares y tantos otros cuyos nombres no se encuentran reflejados , ya que la lista sería interminable...

# CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
1.1. GENERALIDADES DE LA ESPECIE ( <i>Lama pacos</i> ) .....	15
1.2 Hábitat .....	15
1.3 Reproducción.....	16
1.4 Anatomía .....	16
1.5 Conducta .....	17
1.6 Fibra de Alpaca .....	18
1.7 Alimentación .....	19
1.8 Razas de alpaca .....	19
<b>2. TRONCO DEL ENCÉFALO .....</b>	<b>20</b>
<b>3. NEUROPEPTIDOS .....</b>	<b>21</b>
3.1 Filogenia.....	22
3.2 Ontogenia.....	23
3.3 Familia de neuropéptidos.....	23
3.4 Biosíntesis y procesamiento de los neuropéptidos .....	23
3.5 Receptores de neuropéptidos.....	25
3.6 Peptidasas.....	25
<b>4. NEUROPEPTIDOS EN EL TRONCO DEL ENCÉFALO DE LA ALPACA.....</b>	<b>26</b>
4.1 Metionina-encefalina.....	26
4.2 Sustancia P.....	27
4.3 Somatostatina-27.....	27
4.4 -Neo-endorfina.....	29
4.5 Neurotensina.....	30
4.6 -endorfina (1-27).....	31
4.7 Hormona adrenocorticotrópica (18-39) (ACTH) .....	32
<b>II. MATERIAL Y METODOS .....</b>	<b>34</b>
2.1. Procedimiento experimental de la alpaca .....	35
2.2. Perfusión y obtención de las secciones .....	35
2.3. Técnica inmunocitoquímica.....	35
2.4. Obtención y especificidad de los anticuerpos.....	37
A. HORMONA ADRENOCORTICOTRÓPICA (18-39) (ACTH).....	38
B. METIONINA-ENCEFALINA.....	38
C. SUSTANCIA-P.....	38
D. SOMATOSTATINA-28 (1-12).....	39
E. -NEO-ENDORFINA .....	39
F. -ENDORFINA (1-27).....	39
G. NEUROTENSINA.....	39

2.5. Atlas estereotáxicos .....	40
2.6. Densidades de las fibras y de los somas inmunorreactivos.....	40
2.7. Técnicas morfológicas.....	41
2.8. Obtención de la iconografía.....	41
<b>III. ABREVIATURA.....</b>	<b>42</b>
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES .....	48
Distribución de Neuropeptidos en el Tronco del encéfalo de la Alpaca ( <i>Lama pacos</i> )	
A. SOMAS.....	48
B. FIBRAS.....	48
4.2. Distribución de -Neo-endorfina en el tronco del encéfalo de la alpaca.....	50
4.3. Distribución de -endorfina (1-27) en el tronco del encéfalo de la alpaca ...	51
4.4. Distribución de Sustancia P en el tronco del encéfalo de la alpaca.....	52
4.5. Distribución de Metionina-encefalina en el tronco del encéfalo de la alpaca .....	53
4.6. Distribución de Somatostatina -28 (1-12) en el tronco del encéfalo de la alpaca .....	54
4.7. Distribución de Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH) en el tronco del encéfalo de la alpaca.....	55
4.8. Distribución de Neurotensina en el tronco del encéfalo de la alpaca .....	56
<b>V. TABLAS Y GRÁFICOS DE LOS RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
<b>VI. ICONOGRAFIA.....</b>	<b>65</b>
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>80</b>
7.1. Distribución de los neuropeptidos estudiados en el tronco del encéfalo de la alpaca <i>Lama pacos</i> .....	81
7.2. Relación anatómica entre los siete neuropeptidos estudiados en el tronco del encéfalo de la alpaca.....	81
7.3. Posibles acciones fisiológicas de los neuropeptidos en el tronco de l encéfalo de la alpaca.....	82
7.4. Comparación de la distribución de los neuropeptidos estudiados en el tronco del encéfalo de la alpaca con otros mamíferos.....	83
7.4.1. Hormona adrenocorticotrópica (ACTH) .....	84
7.4.2. Sustancia P.....	85
7.4.3. Somatostatina.....	86



7.4.4. Metionina-encefalina.....	88
7.4.5. Neurotensina.....	90
7.4.6. -neo-endorfina.....	91
7.4.7. -endorfina.....	93
7.5. Investigación futura sobre los neuropéptidos en el tronco del encéfalo de la alpaca.....	95
<b>VIII. TABLAS Y GRÁFICOS DE LA DISCUSIÓN.....</b>	<b>97</b>
<b>IX. CONCLUSIONES.....</b>	<b>116</b>
<b>X. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>119</b>

## **Objetivos de la tesis doctoral**

Estudiar en el tronco encefálico de la alpaca la distribución de las fibras y de los somas con neurotensina, somatostatina-28 (1-12), ACTH,  $\beta$ -endorfina (1-27), metionina-enkefalina, sustancia P o con  $\delta$ -neo-endorfina, tras aplicar una técnica inmunocitoquímica. Actualmente, desconocemos la distribución de numerosos neuropéptidos en muchas especies de mamíferos, una de esas especies es la alpaca (*Lama pacos*). Nuestro grupo ha publicado recientemente un estudio sobre la distribución de somas y fibras con el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y con leucina-enkefalina en el tronco del encéfalo de la alpaca, tras aplicar una técnica de inmunocitoquímica (de Souza et al 2007 a, b, 2008). Con este trabajo, ponemos las “primeras piedras” para conocer la distribución de los neuropéptidos en el tronco encefálico de la alpaca, ya que es la primera vez que se estudian los neuropéptidos mencionados al inicio de este apartado. La obtención de los encéfalos de dichos animales ha sido posible gracias a la colaboración científica existente entre el Instituto de Neurociencias de Castilla y León (INCYL, Salamanca) y la Universidad Peruana “Cayetano Heredia” (Lima, Perú).

La distribución de neuropéptidos en el sistema nervioso central de mamíferos, mediante la aplicación de técnicas inmunocitoquímica, viene realizándola nuestro grupo de investigación desde la década de 80. 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, taquiquininas (neuroquinina A, neuroquinina B, sustancia P), opiáceos (metionina-enkefalina, metionina-enkefalina-8, alfa-neo-endorfina, beta-endorfina, dinorfina A), hormona adrenocorticotrópica, hormona estimulante de los melanocitos, galanina, hormona liberadora de la hormona luteinizante, angiotensina II y 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 (Conrath et al., 1986; Coveñas et al., 1986, 1988, 1989a,b, 1990a, b, c, 1993, 1994, 1996a, b, c, 1997, 1999, 2000, 2001, 2002, 2003a, b, 2004, 2008; Burgos et al., 1988; Aguirre et al., 1989a, b; Fuxe et al., 1990; de León et al., 1991a, b, c; 1992a, b, 1994; Marcos et al., 1993a, b, 1994a, b, c; 1996, 1997, 1998; Velasco et al., 1993; Vázquez et al., 1998; Samsam et al., 1999, 2000, 2001; Belda et al., 2000, 2003; Pego-Reigosa et al., 2000, 2001; Pesini et al., 2001, 2004; Martín et al., 2003; Aguilar et al., 2004; Cuadrado et al., 2005; Sánchez et al., 2005, 2007; Díaz-Cabiale et al., 2008). 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.

Queremos reseñar que el conocimiento de la distribución de los somas y de las fibras peptidérgicas en el sistema nervioso central de mamíferos en general y de la alpaca en particular permitirá:

**1** Comparar la distribución del mismo neuropéptido en el sistema nervioso central de varias especies (rata, gato, perro, mono, hombre). Este estudio comparativo nos permite conocer, en las distintas especies estudiadas, si la distribución de un neuropéptido es parecida o no. También, nos permite afirmar, en el caso que la distribución sea diferente, si es debida a que:

- Hay diferencias entre las especies estudiadas (es decir que en una especie la distribución de un neuropéptido es más amplia que en la otra especie) o
- Las diferencias podrían ser debidas a que la metodología que se aplicó en ambas especies no ha sido la misma (por ejemplo, en una especie se administró colchicina, en la otra no).

**2.** Permite conocer si hay una relación anatómica entre dos o más neuropéptidos. Es decir, conocer si en la mayoría de los núcleos del sistema nervioso central en donde encontramos, por

ejemplo neurotensina, encontramos también somatostatina. Si existiera esta relación anatómica, se podría plantear la hipótesis de una relación funcional entre ambos neuropéptidos ( por ejemplo, que la neurotensina controlase la liberación de la somatostatina o viceversa).

**3.** Las técnicas inmunocitoquímica permiten también proponer la coexistencia de neuropéptidos. Ya que si las características morfológicas (tamaño, forma), así como la distribución dentro de l núcleo de las neuronas peptidérgicas con metionina encefalina coinciden plenamente con las que contienen otro neuropéptido, se puede afirmar que ambos neuropéptidos podrían coexistir en la misma neurona.

**4.** También, permiten proponer vías peptidérgicas. Así, si en un núcleo encontramos que hay numerosos somas inmunorreactivos y ninguna o muy escasas fibras inmunor reactivas, indica que las neuronas peptidérgicas observadas son neuronas de proyección. Mientras, que si encontramos en un núcleo muchas fibras inmunorreactivas y ningún soma, indicaría que dicho núcleo recibe aferencias peptidérgicas.

**5.** Por último, dependiendo en dónde se localiza el neuropéptido estudiado, se pueden proponer las posibles acciones fisiológicas que podría realizar dicho neuropé ptido. Así, si demostramos tras aplicar una técnica inmunocitoquímica, la presencia de fibras inmunorreactivas conteniendo un determinado neuropéptido en un núcleo que se sabe previamente que interviene en la transmisión del dolor, la presencia de dicho ne uropéptido indica que podría intervenir en transmitir y/o modular la información nociceptiva.

**6.** En el caso de la alpaca, hemos de indicar que los resultados obtenidos en la tesis doctoral han sido a partir de animales que vivieron siempre a nivel del mar . En un futuro, compararemos los resultados obtenidos en la tesis doctoral con aquellos que se obtengan a partir de animales que

vivieron siempre a más de 3.500 m de altitud, ya que en estos últimos tenemos pensado estudiar la distribución (fibras y somas) de los mismos neuropéptidos estudiados en esta tesis doctoral.

7. En este trabajo recogemos los datos más significativos publicados por otros estudios sobre la distribución de neuropéptidos en el tronco del encéfalo de la alpaca (ver de Souza et al 2007a, b, 2008). Esos trabajos serán utilizados en la discusión y nos permitirán comparar la distribución de los neuropéptidos estudiados aquí con los ya descritos en otras especies.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## 1.1 GENERALIDADES DE LA ESPECIE *Lama pacos*

Es un camélido sudamericano que está estrechamente emparentado con la llama y la vicuña. La alpaca es más pequeña que la llama, su lana es más larga y suave, y no se suele usar como bestia de carga. El hábito de escupir (el animal muestra agresividad o lo utiliza como método de defensa) es común en la alpaca y en la llama. La fibra de lana de la alpaca es elástica, fuerte y más sedosa que la de la oveja. Aunque la carne de alpaca es comestible, el animal se utiliza sobre todo por su lana, de la cual se fabrican prendas de vestir de gran calidad.



Alpaca (*Lama pacos*)

## 1.2 Hábitat

La alpaca y otros camélidos sudamericanos se distribuyen desde el norte del Perú hasta el norte de Argentina, incluyendo las respectivas áreas alto andinas de Bolivia y Chile. En general, los camélidos pueden habitar desde el nivel del mar hasta las regiones alto andinas a más de 5.000 m de altitud. La vicuña y la alpaca prefieren las zonas más altas, mientras que el guanaco y la llama pueden habitar hasta el nivel del mar.



Area de distribución de la alpaca

### 1.3 Reproducción

El periodo de gestación de una alpaca es aproximadamente de once meses y medio, al cabo de los cuales da a luz a una cría (en raras ocasiones a dos) de aproximadamente 7 Kg. Los machos emiten un sonido denominado “orgling” durante el apareamiento que puede durar desde 15 minutos a una hora. Se sabe que 24-36 horas después del apareamiento, se produce la ovulación.

### 1.4 Anatomía

La alpaca presenta una silueta más curva y pequeña que la de la llama y en la frente presenta un típico mechón. No posee un color característico, ya que presenta muchas tonalidades. Puede alcanzar hasta una altura de 1,50 m y un peso máximo de 70 a 80 Kg. En general, posee más y mejor lana que la llama. La longevidad de la alpaca es alta (14 años de vida media), aunque algunos animales han alcanzado los 20 años. Debido a la anatomía de sus miembros, son



animales que no generan daño mecánico a los suelos, aún en zonas áridas, ya que estos animales se han adaptado a medios áridos y ecológicamente frágiles. Así, por ejemplo, presentan labio leporino (labio hendido) que le confiere una gran ventaja, pues les permite comer hierba con gran eficacia.

Son animales que pueden criarse consumiendo forraje de baja calidad y digestibilidad, en donde otros rumiantes tendrían serias dificultades para sobrevivir. Además, los requerimientos nutricionales de la alpaca son sensiblemente menores a los que presentan otros rumiantes de similar tamaño.

Otra particularidad de la alpaca son los incisivos que se ubican oblicuamente y tienen un crecimiento continuo, semejante al de los roedores. Por esta cualidad son muy longevos, pues les permite seguir cosechando forraje eficientemente a pesar del paso de los años. Finalmente, indicar que la alpaca es un herbívoro muy eficaz en convertir el forraje que ingiere en carne. Algunos trabajos de investigación han demostrado, que es hasta un 58% más eficaz que los ovinos, en transformar alimento (forraje) en peso vivo.

## **1.5 Conducta**

Las alpacas son animales sociales que viven formando rebaños que generalmente están compuestos por un macho dominante (alcanza la madurez sexual aproximadamente a los 4-5 años de edad) y varias hembras acompañadas de sus crías; el resto de los machos forman otro rebaño. Las alpacas hembras presentan una jerarquía dentro del rebaño, ya que hay una hembra dominante. El macho intenta mantener alejados a los depredadores de su territorio y cuando un joven macho del rebaño llega a tener alrededor de ocho meses de edad, lo alejará fuera del

rebaño (de esta forma se previene la endogamia). Es frecuente observar a los machos peleando durante la época de celo, cuando alguno intenta ocupar el puesto dominante del otro. En general, las alpacas son muy mansas, incluso los machos no son peligrosos.

Las alpacas tienen una memoria excelente. Pueden aprender una tarea en 2 -5 repeticiones y lo recordarán para siempre, aún cuando no se las vuelva a reforzar. Las alpacas se comunican a través de la voz (pueden cloquear, bufar, gritar, o hacer un sonido especial de alarma) y la posición de la cola, cuello y orejas.

## **1.6 Fibra de Alpaca**

El vellón de la alpaca es uno de los productos del animal más apreciados en el mercado. Está constituido por fibras finas y gruesas: las finas se encuentran en la parte del lomo y los flancos del animal, mientras que las gruesas se concentran principalmente en la región pectoral, extremidades y cara. El diámetro de la fibra de alpaca oscila entre 18 y 33 micras, dependiendo de la parte del cuerpo y de la edad del animal. La resistencia de la fibra es muy importante en los procedimientos textiles: la de la alpaca es tres veces mayor que la resistencia que presenta la lana de ovino.

La fibra de alpaca es suave al tacto y tiene un alto poder de higroscopicidad, que le permite absorber la humedad ambiental entre un 10% -15%, no afectando a su aspecto. Otra característica importante de la fibra de alpaca es la capacidad de mantener la temperatura corporal. En cuanto al color de la fibra, es posible encontrar más de 16 colores diferentes que varían desde el blanco hasta el negro, pasando por las tonalidades cremas y tonos marrones, plateados y grises. Finalmente, indicar que en los procedimientos textiles, la fibra de alpaca tiende a

separarse y precisa que se combine con otras fibras naturales o sintéticas que ejercen el efecto contrario.

## **1.7 Alimentación**

Las alpacas son herbívoros rumiantes que se pueden alimentar de los pastos que crecen en las zonas húmedas (o bojedales) ubicados por encima de los 4.000 m de altitud. La dieta forrajera es poco selectiva y pueden pastorear y ramonear todo tipo de vegetación. Pueden consumir forrajes de baja calidad y digestibilidad gracias a su eficiente aparato digestivo muy superior al que presentan otros rumiantes, los cuales tendrían serias dificultades en digerir dichos pastos. El consumo medio de un macho adulto es de aproximadamente 1,5 -2 Kg de materia seca; en el caso de alpacas hembras (durante el último tercio de la gestación, durante el inicio de lactancia) necesitan ingerir hasta 3 Kg de materia seca.

## **1.8 Razas de alpaca**

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.

Las alpacas blancas abundan en la región sur de los Andes. La industria textil prefiere la fibra blanca (raza huacaya) como materia prima para ser procesada industrialmente (la fibra blanca es teñida con tintes sintéticos). Desde la perspectiva de la conservación de la diversidad biológica

en los Andes, esta situación está ocasionando la pérdida de las alpacas de la raza suri, que se encuentra en franco proceso de extinción, afectando al futuro de esta especie animal y a la subsistencia de los grupos humanos ligados a su crianza en los Andes.

## **2. Tronco del Encéfalo**

Esta estructura, en la que hemos centrado nuestro estudio, se deriva embriológicamente de la vesícula mesencefálica (Shepherd, 1988). Está dividida desde la región más caudal a la más rostral en tres regiones: el bulbo raquídeo (médula oblonga o mielencéfalo), la protuberancia (metencéfalo) y el mesencéfalo. El tronco del encéfalo se caracteriza por ser una extensión rostral de la médula espinal que recibe aferencias somáticas y viscerales, y emite eferencias motoras. Además, contiene a la formación reticular que presentan grupos de neuronas que proyectan e influyen sobre muchas zonas del sistema nervioso central. La formación reticular y los núcleos específicos (agrupamiento de somas neuronales) del tronco del encéfalo intervienen en numerosas e importantes acciones como: sueño, vigilia, dolor, analgesia, procesos visuales y auditivos, control motor, mecanismos cardiovasculares, respiración, comportamiento sexual, atención, dilatación de las pupilas, entre otras (Martin, 1998).

En el tronco del encéfalo se originan gran parte de los doce pares craneales que inervan la cabeza, el cuello y los órganos sensoriales, los cuales a su vez llevan información sensorial y motora. Un ejemplo de ello es el nervio trigémino (V par) que lleva la información sensitiva (tacto-presión, dolor, frío, calor, propiocepción) de la cara, de la mucosa de la cavidad oral, de dos tercios de la lengua y de la pulpa dental. Además, el trigémino lleva la información motora, pues por él transcurren los axones que inervan a los músculos de la masticación y al músculo tensor del tímpano (ver Coveñas et al, 2007 a).

### 3. Neuropéptidos

Son moléculas formadas por cadenas cortas de aminoácidos (generalmente menos de 100 que se sintetizan en las células nerviosas (Coveñas et al., 2007a, b). Además, son sustancias neuroactivas que pueden actuar como neurotransmisores, neuromoduladores y neurohormonas (Mangas et al., 2007). Así, la liberación de un determinado neuropéptido al espacio extracelular a partir de una neurona peptidérgica, implica que el neuropéptido puede ejercer:

1. Una acción paracrina (neuromoduladora). El neuropéptido se une a sus receptores localizados en el componente postsináptico situado algo alejado del lugar en donde se liberó (es la transmisión por volumen).
2. Una acción autocrina (neuromoduladora). El neuropéptido se une a los autoreceptores localizados en el componente presináptico. De esta forma, controla la liberación del mismo neuropéptido a partir del componente presináptico.
3. Una acción neurotransmisora (se une a receptores localizados en el componente postsináptico próximo); es la denominada sinapsis química.
4. Una acción fisiológica muy alejada del lugar en donde se liberó (sangre o líquido cefalorraquídeo) (neurohormona).

Los neuropéptidos están ampliamente distribuidos por el sistema nervioso central de mamíferos (Pego-Reigosa et al., 2000; Coveñas et al., 2001, 2002, 2003a,b, 2004, 2008; Pesini et al., 2004; Mangas et al., 2007) y están involucrados en numerosas acciones fisiológicas tales como: ingesta de alimentos y de líquidos, termorregulación, analgesia, nocicepción, ansiedad, control neuroendocrino, regulación gastrointestinal, regulación del sistema inmune, inflamación, regulación del páncreas y de los riñones, controlan la liberación de los neurotransmisores clásicos, así como también intervienen en el comportamiento reproductor y mecanismos cardiovasculares, respiratorios, auditivos y visuales, ejercen una acción antimicrobiana, ejercen acciones neurotróficas, actúan como neuroprotectores, ejercen una acción mitogénica sobre las

células tumorales e intervienen en la memoria y en el aprendizaje (Saito et al., 2001; Muñoz et al., 2005; Coveñas et al., 2007a, b).

### **3.1 Filogenia**

Exceptuando las esponjas, en toda la escala animal desde cnidarios (medusas, corales, anémonas de mar, entre otros) hasta el hombre se han descrito neuropéptidos (metionina -encefalina, sustancia P, FMRFamina, hormona adrenocorticotrópica, -endorfina, vasopresina, polipéptido intestinal vasoactivo, entre otros). Esto indica que la secuencia de aminoácidos de determinados neuropéptidos se ha conservado a lo largo de la escala animal. Sin embargo, en general, se puede afirmar que hay pocos neuropéptidos relacionados (con secuencias de aminoácidos parecidas) entre invertebrados y vertebrados. Es decir, hay neuropéptidos típicos de vertebrados y otros típicos de invertebrados (Murphy y Turner, 1990). Hay que indicar que algunos de los péptidos que se han descrito en el sistema nervioso de vertebrados han sido también localizados en protozoos (hormona adrenocorticotropa, beta-endorfina, colecistoquinina y somatostatina), bacteria (ACTH, beta-endorfina...) y plantas (TRH, beta-endorfina) (Coveñas et al 2007a, b).

A manera de ejemplo podemos destacar el neuropéptido Y del hombre, cobaya, conejo, rata y de reptiles; en todos los casos presenta la misma secuencia de aminoácidos. Sin embargo, la secuencia del neuropéptido Y de aves y de anfibios difiere con respecto a los anteriores en un solo aminoácido (ver Coveñas et al 2007 a, b). Se puede afirmar, según estos resultados, que el neuropéptido Y se mantiene muy conservado a lo largo de la escala animal. En el caso de la sustancia P, la secuencia de aminoácidos es idéntica en los mamíferos indicados anteriormente, sin embargo la sustancia P en otros vertebrados no mamíferos presentan un bajo porcentaje de homología con respecto a la secuencia de aminoácidos que presentan los mamíferos. Es decir, en la escala animal, la conservación de la secuencia de aminoácidos de la sustancia P es menor que la observada para el neuropéptido Y (Coveñas et al 2007a, b).

## **3.2 Ontogenia**

Se ha demostrado que durante las fases tempranas del desarrollo aumentan las concentraciones de diversos neuropéptidos, en comparación con los niveles que presentan en fases más tardías. Se ha demostrado también que la administración de un neuropéptido (ej., polipéptido intestinal vasoactivo) durante un período concreto del desarrollo embrionario, facilita el correcto desarrollo del embrión. Sin embargo, si durante ese mismo periodo se administran antagonistas del polipéptido intestinal vasoactivo, se producen daños graves en dicho desarrollo (ver Coveñas et al 2007a, b).

## **3.3 Familia de neuropéptidos**

Los neuropéptidos se clasifican de acuerdo a la homología que presenta sus secuencias de aminoácidos. Teniendo en cuenta esas homologías, los neuropéptidos (cuyas secuencias de aminoácidos son muy parecidas) se pueden agrupar en las siguientes familias: bombesina y péptido liberador de gastrina, colecistoquinina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), neuropéptido Y, neurotensina, oxitocina y vasopresina, taquiquinas (sustancia P, neuroquinina A y B...), polipéptido intestinal vasoactivo (VIP), péptidos opiáceos (metionina - encefalina, beta-endorfina, alfa-neo-endorfina...) (ver Coveñas et al 2007a,b).

Existen otros neuropéptidos no incluidos en las familias anteriores, como por ejemplo: hormona adrenocorticotropa, hormona estimulante de los melanocitos (MSH), galanina, hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH), factor liberador de corticotropina (CRF), hormona liberadora de tirotropina (Coveñas et al 2007a,b).

## **3.4 Biosíntesis y procesamiento de los neuropéptidos**

Los neuropéptidos se sintetizan de acuerdo al siguiente proceso:

- 1) **Transcripción:** El ARN-mensajero del pre-pro-péptido se origina a partir del ADN;
- 2) **Traducción:** El ARN-mensajero es leído por los ribosomas y se sintetiza el pre-propéptido;
- 3) **Formación del pro-péptido o precursor:** el pre-pro-péptido localizado en el interior de las cisternas del retículo endoplasmático rugoso, mediante la acción de una endopeptidasa que se localiza en la membrana del retículo, es transformado en propéptido o precursor;
- 4) **Procesado post-transduccional:** ocurre en el retículo endoplasmático rugoso, complejo de Golgi y/o en las vesículas que se originan a partir de este. Consiste en escindir el precursor mediante la acción de peptidasas y en modificar químicamente (glicosilación, fosforilación y/o sulfatación) al precursor, originándose de esta forma los neuropéptidos;
- 5) **Liberación de los neuropéptidos:** son liberados al espacio extracelular mediante exocitosis (proceso mediado por calcio) (ver Coveñas et al 2007a, b).

El proceso señalado anteriormente indica que:

- a. Varios neuropéptidos pueden originarse a partir del mismo precursor o propéptido.
- b. Si hay una mutación y como resultado se cambia un aminoácido por otro en la secuencia de aminoácidos de un precursor, se podrían originar neuropéptidos atípicos, ya que las enzimas proteolíticas no romperían al precursor por el lugar en donde el aminoácido ha sido cambiado.
- c. Los pro-péptidos o precursores pueden ser procesados de diferentes formas en las distintas zonas del sistema nervioso (dependiendo del sitio de acción sobre el cual las enzimas proteolíticas actúan) (ver Coveñas et al 2007a, b). En general, se puede decir que la distribución en el sistema nervioso central de los neuropéptidos que proceden del mismo precursor es muy parecida. Sin embargo, hay neuropéptidos que proceden del mismo precursor que tienen distinta distribución. Esta podría estar determinada por el transporte interneuronal de los neuropéptidos, ya que se ha descrito que hay neuropéptidos que son transportados exclusivamente hacia el axón



y las dendritas, y otros neuropéptidos (que pertenecen al mismo precursor) que permanecen exclusivamente en el soma neuronal (ver Coveñas et al 2007a, b).

Finalmente, las modificaciones químicas (glicosilación, sulfatación, fosforilación, ciclación, acetilación y amidación) que sufren los neuropéptidos sirven entre otras cosas para: potenciar/inhibir su actividad funcional y/o resistir más tiempo la acción de las peptidasas que degradan a los neuropéptidos (ver Coveñas et al 2007a, b).

### 3.5 Receptores de neuropéptidos

Los receptores de neuropéptidos están asociados a una proteína G (ver Coveñas, 2007a, b). La proteína G, a su vez, puede estar acoplada a:

**a. Adenilato-Ciclasa.** La proteína G estimula a la enzima adenilato-ciclasa, la cual estimula la síntesis del segundo mensajero (AMPc). En este caso la proteína G se denomina Gs.

**b. Canal.** La proteína G regula el flujo de iones a través del canal. Abre canales de potasio y cierra canales de calcio. Además, la proteína G inhibe a la adenilato ciclasa. En este caso la proteína G se denomina Gi/o.

**c. Fosfolipasa C.** La proteína G activa a la fosfolipasa C, que genera el diacilglicerol e inositol trifosfato (IP3). El IP3 favorece la liberación de calcio (segundo mensajero) almacenado intracelularmente y por lo tanto aumenta su concentración a nivel intracelular. En este caso la proteína G se denomina Gq/11 (ver Coveñas et al 2007a, b).

### 3.6 Peptidasas

Una vez separados los neuropéptidos del receptor al que estaban unidos, son degradados por la acción de las peptidasas (ver Coveñas et al 2007a, b). Estas están localizadas en las membranas plasmáticas de las neuronas o de la glía (su zona activa está orientada hacia el espacio

extracelular), así como en el plasma sanguíneo (ver Coveñas et al 2007a, b). Las peptidasas se pueden clasificar en (ver Coveñas et al 2007a, b):

**a. Endopeptidasas:** rompen las uniones de aminoácidos no terminales. Pertenecen a este grupo entre otras, la endopeptidasa 24.11 (encefalinas) y la endopeptidasa 24.15.

**b. Exopeptidasa:** rompen las uniones de aminoácidos terminales. Son exopeptidasas por ejemplo, la EC 3.4.15.1, la enzima convertidora de angiotensina (ACE), la aminopeptidasa N, la aminopeptidasa P, la aminopeptidasa B y la carboxipeptidasa.

## **4. Neuropéptidos en el tronco del encéfalo de la alpaca *Lama pacos***

### **4.1 Metionina-Encefalina**

Este pentapéptido se origina a partir del precursor pro-encefalina y presenta la siguiente secuencia de aminoácidos: Tyr-Gly-Gly-Phe-Met (Hoyle, 1996). Actúa como un neurotransmisor y/o un neuromodulador y está implicado en la analgesia y en mecanismos cardiovasculares y motores (Akil et al., 1984; Basbaum y Fields, 1984; Pasternak, 1987; Douglas y Kitchen, 1992).

Mediante la aplicación de técnicas inmunocitoquímica y de radioinmunoensayo, se ha estudiado la distribución de metionina-encefalina en el sistema nervioso central (por ejemplo, globo pálido, núcleo caudado, putamen, corteza cerebral, colículo superior, sustancia negra, hipotálamo y sustancia gris periacueductal) de la rata, gato, mono y hombre (Pittius et al., 1984; Zamir et al., 1983; Fallon y Leslie, 1986; Murakami et al., 1987; al., Aguilar et al., 2004) y particularmente en el tronco del encéfalo del gato, del hombre y del mono *Macaca fascicularis* (Ibuki, et al., 1989; Belda et al., 2003; Coveñas et al., 2004, 2008). Según lo indicado, la distribución de los somas y

de las fibras inmunomarcadas con metionina -encefalina en el tronco del encéfalo de la alpaca no se ha realizado previamente.

## **4.2 Sustancia P**

Es un undecapéptido que se origina de la pro-taquiquinina A y presenta la siguiente secuencia de aminoácidos: Arg-Pro-Lys-Pro-Gln-Gln-Phe-Phe-Gly-Leu-Met-NH<sub>2</sub> (Hoyle, 1996; Stahl, 1999). Este péptido participa en la transmisión del dolor, así como también en los procesos inflamatorios (Moussaoui et al., 1992). Así mismo, se ha demostrado que la sustancia P participa en los mecanismos de estrés agudo (Gerancioti et al., 2006). En rata, aplicando técnicas inmunocitoquímicas, se ha descrito la presencia de neuroquinina A (NKA) y sustancia P en el núcleo caudal del trigémino, después de estimular eléctricamente y unilateralmente el ganglio del trigémino (Samsam et al., 2000, 2001). Estas observaciones indican que ambos neuropéptidos ejercen un efecto excitador sobre las neuronas responsables de la transmisión dolorosa localizadas en dicho núcleo. Además, se han realizado estudios que demuestran la presencia de fibras y somas marcados con sustancia P en el gato y en la rata (Inagaki y Parent, 1984); es de destacar que dichos estudios se realizaron en áreas específicas del sistema nervioso central como son la sustancia negra y el núcleo dorsal del rafe; así como en el tronco del encéfalo humano (Nomura et al. 1987; del Fiacco et al., 1983, 1984; Bouras et al., 1986; Rikard-Bell et al., 1990; Baker et al., 1991; Chigr et al., 1991; Halliday et al., 1990; Wang et al., 1992a; Gai et al., 1993; Jordan et al., 1995; Charara y Parent., 1998).

## **4.3 Somatostatina-28 (1-12)**

Con el término de somatostatina se incluyen a una serie de neuropéptidos (somatostatina -14, somatostatina-28 (1-12) y somatostatina-28), que proceden del procesamiento de una cadena de

aminoácidos denominada pro-somatostatina y que está codificada por un solo gen en mamíferos (Goodman et al., 1983). Se han realizado estudios para determinar la distribución de somatostatina-28 utilizando técnicas de radioinmunoensayo e inmunocitoquímica en el sistema nervioso central de rata (Brownstein, et al., 1975; Elde y Parsons, 1975; Alpert et al., 1976; Dierickx y Vandesande, 1979; Barden et al., 1981; Finley et al., 1981; Wynne y Robertson, 1997), cobaya (Taber-Pierce et al., 1985), ratón (Shimada e Ishikawa, 1989), así como de somatostatina-28 (1-12) en el perro (Pego-Reigosa et al. 2001). Se ha descrito también somatostatina-28 y somatostatina-28 (1-12) en la corteza y el tronco del encéfalo del mono *Macaca fascicularis* (Beal et al., 1986, 1987; Lewis et al., 1986; Amaral et al., 1989; Coveñas et al., 2008). Se han observado estructuras inmunorreactivas con somatostatina-28 y somatostatina-28 (1-14) en el hombre (Bugnon et al., 1977; Dèsy y Pelletier, 1977; Eckernäs et al., 1978; Cooper et al., 1981; Bouras et al., 1987). La distribución de la somatostatina en el sistema nervioso central de mamíferos es muy amplia. Este hecho indica que la somatostatina interviene en numerosas acciones fisiológicas, por ejemplo, que actúa como neuromodulador, participando en la liberación de neurotransmisores clásicos como la acetilcolina y la serotonina, así como en la inhibición de la liberación de noradrenalina; además, ejerce un papel importante a nivel de la corteza motora y del sistema límbico (Reichlin, 1983). Así mismo, influye en la motricidad, controla el sueño y el apetito e interviene en la nocicepción, analgesia, aprendizaje y en la memoria (Epelbaum et al., 1994; Schindler et al., 1996). Se ha comprobado que tras su administración hay una disminución de las horas de sueño, así como hay dificultad en la respiración e hipersensibilidad a los estímulos táctiles (Reichlin, 1983). Además, la somatostatina inhibe la liberación de la hormona del crecimiento (Reichlin, 1983). También se ha propuesto el posible papel que puede jugar este neuropéptido durante la ontogenia (intervendría en la maduración de las vías nerviosas) (Shiosaka et al., 1982; Morley et al., 1985; Chigr et al., 1989), así como del posible papel que ejerce en el mantenimiento del encéfalo en los estadios adultos, ya que se han descrito alteraciones neurológicas y neuropsiquiátricas como

consecuencia de una variación en la concentración del mencionado neuropéptido o bien debidas a la alteración de sus receptores (Palacios et al., 1990).

Por último, hemos encontrado estudios en los que se habla de las neuronas de la corteza que contienen éste neuropéptido como una posible subclase de neuronas gabaérgicas de mamíferos, y en los que se postula que algunas de estas neuronas pueden tener funciones similares a las que poseen las neuronas reticulares talámicas (Schmechel et al., 1984).

En el sistema nervioso central del mono (*Macaca fascicularis*) se han realizado estudios sobre la distribución de fibras y somas inmunorreactivos con somatostatina -28 (1-12) en el tronco del encéfalo (Coveñas et al., 2008). También, se ha estudiado la co-existencia de somatostatina-28 con otras sustancias neuroactivas a nivel de la corteza cerebral (Hendry et al., 1984).

#### **4.4 -neo-endorfina**

A partir de la pro-dinorfina se originan una serie de péptidos, entre los cuales se encuentra la -neo-endorfina, la dinorfina A y la dinorfina B (Hughes, 1984). El neuropéptido que hemos estudiado (-neo-endorfina) es un marcador específico del precursor pro-dinorfina, ya que no se origina de los otros dos precursores opiáceos (pro-opiomelanocortina, pro-encefalina) de las sustancias opiáceas. La alfa-neo-endorfina fue obtenida por primera vez a partir del hipotálamo y, al igual que los otros neuropéptidos que hemos estudiado, ha sido secuenciada por completo. Se sabe también que la secuencia de éste péptido se ha conservado en todas aquellas especies en las que se ha estudiado (Murphy y Turner, 1990).

Hasta el momento se han realizado un gran número de estudios (mediante radioinmunoensayo e inmunocitoquímica) para determinar la distribución de la prodinorfina, así como de sus derivados en el sistema nervioso central de mamíferos (Vicent et al., 1982; Weber et al., 1982; Cone et al., 1983; Palkovits et al., 1983; Weber y Barchas, 1983; Fallon y Leslie, 1986). En lo que concierne a la alfa-neo-endorfina, se han realizado estudios en el sistema nerviosos central

de la rata (Weber et al., 1982; Cone et al., 1983; Palkovits et al., 1983), del perro (Pesini et al., 2001), del mono (*Macaca fascicularis*) (Coveñas et al., 2008), mientras que en el gato, se ha estudiado la distribución de fibras y somas inmunorreactivos a nivel del tronco encefálico y de la amígdala (Marcos et al., 1993b, 1998; Coveñas et al.; 2000). En éste último estudio se ha descrito la presencia de alfa-neo-endorfina, en el núcleo espinal del trigémino del gato, lo que indica que este neuropéptido está involucrado en la transmisión y/o en la modulación nociceptiva (Coveñas et al.; 2000). Sin embargo, no se han realizado estudios sobre la distribución de fibras y somas inmunomarcados con alfa-neo-endorfina en el tronco del encéfalo del hombre.

#### **4.5 Neurotensina**

Es un péptido de 13 aminoácidos Glu-Leu-Tyr-Glu-Asn-Lys-Pro-Arg-Arg-Pro-Tyr-Ile-Leu-COOH que se aisló por primera vez en el hipotálamo, ejerciendo efectos vasodilatadores e hipotensivos. Se encuentra en altas concentraciones en áreas involucradas en el comportamiento, como la amígdala, el núcleo accumbens, el locus coeruleus, la sustancia gris periacueductal, la habénula y en algunos núcleos hipotalámicos. Hay numerosos estudios publicados sobre la distribución de la neurotensina en el sistema nervioso central de mamíferos y sobre las funciones en las que intervienen (Moga y Gray, 1985; Mai et al., 1987; Palkovits, 1988; de León et al., 1991a, b; Marcos et al., 1996, 1997, 2007; ver Coveñas et al., 2007a).

Por ejemplo, interviene en varias actividades biológicas (glucorreguladoras, hemodinámicas, neuroendocrinas, termorreguladores...). Controla la presión sanguínea (vasodilatación e hipotensión), además tiene otros efectos periféricos como la disminución de la actividad motora, estimulación de la contracción uterina, relajación del duodeno, incremento de la permeabilidad vascular y disminución de la secreción gástrica.

Además tiene otros efectos: estimula la secreción pancreática, interviene en la homeostasis, reduce la ingesta de alimentos y modula la liberación de dopamina.

Las acciones centrales de la neurotensina incluyen la analgesia, la hipotermia y la liberación de las hormonas ACTH, FSH y LH. Cuando se aplica localmente, la neurotensina inhibe la actividad de las neuronas del locus coeruleus, pero excita a las neuronas de la médula espinal.

#### **4.6 -Endorfina (1-27)**

Este neuropéptido pertenece a la familia de los péptidos opiáceos y procede de la pro-opiomelanocortina. A partir de ésta se originan además, la  $\mu$ -endorfina,  $\delta$ -endorfina y la  $\kappa$ -endorfina (1-31). La  $\delta$ -endorfina es un marcador específico del precursor pro-opiomelanocortina, ya que ninguno de los otros dos precursores opiáceos (pro-encefalina A y pro-dinorfina) origina dicho neuropéptido.

La  $\delta$ -endorfina (1-27) ha sido estudiada en el sistema nervioso central (tronco del encéfalo) del gato (Coveñas et al., 1999). En el sistema nervioso central de mamíferos han sido más estudiados otros neuropéptidos procedentes de la pro-opiomelanocortina como la  $\mu$ -endorfina (1-31). Actualmente, conocemos su distribución en el sistema nervioso central de la rata, del gato y del hombre (Liotta y Krieger, 1983; Palkovits, 1988). Además, la  $\delta$ -endorfina (1-31) ha sido involucrada en los mecanismos nociceptivos y respiratorios, en el estrés y en envejecimiento, así como en el comportamiento sexual e ingesta (Liotta y Krieger, 1983). También, se ha descrito que interviene en la modulación de la glándula pituitaria, en la respuesta del sistema nervioso parasimpático y en la actividad de diversos neurotransmisores (dopamina, serotonina y acetilcolina) (Liotta y Krieger, 1983). Finalmente, ha sido relacionada con los mecanismos de control de la presión sanguínea, con la termorregulación, con el control de la síntesis de proteínas

y del ARN y con el control de la actividad de la enzima adenilato ciclasa (Liotta y Krieger, 1983).

#### **4.7 Hormona adrenocorticotrópica (18-39) (ACTH)**

Esta hormona es un péptido no opiáceo derivado del procesamiento de la proopiomelanocortina. Está implicada en mecanismos como el aprendizaje, memoria, analgesia, termorregulación, estrés, locomoción y envejecimiento. También, interviene en el comportamiento sexual y en los mecanismos de defensa; regula la actividad de diversos neurotransmisores centrales, la síntesis de ARN y la actividad de la adenilato ciclasa (Liotta y Krieger, 1983; Khachaturian et al., 1985b). Tiene también un papel importante durante el periodo de formación del encéfalo, ya que tras la administración de ACTH se produce un aumento en la actividad de las ATPasas ( $\text{Na}^+ \text{K}^+$ ) en un 15-30% con respecto a los controles (Huttenlocher y Amemiya, 1978). Se han realizado estudios inmunocitoquímicos para determinar la distribución de ACTH (1-39) en el tronco del encéfalo de la rata (Joseph, 1980; Joseph et al., 1983); también, se han realizado estudios en la corteza encefálica y en el tronco del encéfalo del mono *Macaca fascicularis* (Abrams et al., 1980). Además, se ha observado la presencia de estructuras inmunomarcadas con ACTH (1-39) en el sistema nervioso central de la rata (Liotta y Krieger, 1983; Romagnano y Joseph, 1983; Pilcher y Joseph, 1984; Palkovits y Browstein, 1985; Joseph y Michael, 1988; Palkovits, 1988; Léger et al., 1990), y en el diencéfalo del gato (Kitahama et al., 1984, 1986; Rao et al., 1986). Se han observado estructuras marcadas con ACTH (18-39) en el hipotálamo, zonas límbicas, tronco del encéfalo y medula espinal del hombre (Zaphiropoulos et al., 1991). La distribución de la hormona adrenocorticotropa (18-39) ha sido previamente estudiado mediante las técnicas de inmunocitoquímica en el tronco del encéfalo del perro (Pesini et al., 2004) y del mono *Macaca fascicularis* (Khachaturian et al., 1984; Coveñas et al., 2008), así como en el diencéfalo de gato (Coveñas et al., 1996a), pero hasta el momento no hemos encontrado datos



específicos acerca de la distribución de la hormona adrenocorticotropa (18-39) en el tronco del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*). Así es la primera vez que se realiza un estudio detallado de este neuropéptido en el tronco del encéfalo de la alpaca.

**II. MATERIAL**

**Y**

**METODOS**

## **2.1. Procedimiento experimental**

Para realización de este trabajo se han utilizados cuatro alpacas (*Lama pacos*) machos adultos (raza huacaya) (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) en condiciones estándar de luz, temperatura y alimentación (con libre acceso al alimento y agua).

## **2.2. Perfusión y obtención de las secciones**

Los animales, una vez anestesiados profundamente con ketamina (10 mg/kg) y xilacina (4 mg/kg) (ambos suministrados 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 troncos del encéfalo fueron diseccionados y post fijados durante 12 h en el mismo fijador. Posteriormente, los troncos del encéfalo se colocaron en soluciones crecientes de sacarosa (10% al 30%) con la finalidad de crioprotegerlos. Más tarde, secciones transversales seriadas de 50  $\mu$ m 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 el violeta de cresilo/hematoxilina-eosina (Mangas et al., 2007).

## **2.3. Técnica inmunocitoquímica**

Realizamos los siguientes pasos:

1. Incubación de las secciones en PBS con 30% de peróxido de hidrógeno, 20% de amoníaco y 1% de hidróxido de sodio (con la finalidad inactivar las peroxidasas endógenas) durante veinte minutos.

A continuación lavamos las secciones en PBS durante un periodo de diez minutos, proceso que se efectuó tres veces consecutivas.

2. Incubación de las secciones en tampón PBS con 1% de suero normal de caballo y 0,3% de Tritón X-100 (mezcla) durante treinta minutos en agitación y a temperatura ambiente. Este paso se realizó para facilitar la penetración de los anticuerpos.

3. Incubación durante una noche con el primer anticuerpo anti-leucina-encefalina, anti-ACTH (18-39), anti-metionina-encefalina, anti-sustancia P, anti-somatostatina-28 (1-12), anti-CGRP; anti-endorfina, anti-neo-endorfina o anti-neurotensina, diluidas 1/1.500 - 1/3.000 en la mezcla del paso 2. La primera parte de la incubación se efectuó, con agitación, durante dos horas y la segunda parte en reposo, a 4° C durante 12-16 h.

4. Transcurrido ese tiempo realizamos un lavado de las secciones en PBS durante treinta minutos a temperatura ambiente y en agitación.

5. Incubación de las secciones con un anticuerpo biotilado anti-inmunoglobulina G de conejo, diluido 1/200 en la mezcla durante un periodo de una hora a temperatura ambiente y en agitación.

6. Lavado con PBS durante treinta minutos a temperatura ambiente y en agitación.

7. Las secciones fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) (Vectastain), diluido 1/100.
8. Lavado, durante diez minutos (reposo y temperatura ambiente), en tampón Tris -ClH (pH 7,6)
9. Revelado de la peroxidasa con 3, 3' -diaminobenzidina disuelta en 50 ml de Tris -ClH y con 50 µl de peróxido de hidrógeno, durante aproximadamente 5 minutos.
10. Las secciones fueron lavadas con PBS y montadas en portas y cubiertas con una mezcla de PBS/Glicerol (1/1)

#### **2.4. Obtención y especificidad de los anticuerpos**

Los anticuerpos primarios policlonales utilizados en este estudio fueron obtenidos en conejo (De León et al., 1991a, 1992a; Marcos et al., 1993a, 1994a, b; Coveñas et al., 1996a, b, c, 1997, 1999, Belda et al., 2000; Samsam et al., 2000; 2001). Dichos anticuerpos están dirigidos contra sus inmunógenos respectivos, que se prepararon acoplando la molécula peptídica sintética completa o un fragmento (en el caso de la ACTH (18-39), beta-endorfina (1-27) y de la somatostatina-28 (1-12)) 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 diez días después de tres dosis de recuerdo, y periódicamente después (ver Coveñas et al., 2001)

Se han realizado una serie de controles inmunocitoquímicos para determinar la especificidad de la reacción:

1. Sustitución de la solución que contiene el primer anticuerpo primario (ej., anti -somatostatina-28 (1-12)... ) por la mezcla (PBS con un 1% de suero normal de caballo y 0,3% de Tritón X -100).

2. Tratamiento de las secciones tan sólo con 3,3' diaminobenzidina.

En ninguno de los dos casos observamos reacción.

3. Preabsorción del primer anticuerpo:

### **A. Hormona adrenocorticotrópica (18 -39)**

La preabsorción del anticuerpo anti -ACTH (18-39) con ACTH (1-39) o con ACTH (18-39) (100 µg por ml de anticuerpo diluido) produjo la pérdida de la reacción. Cuando se realizó la incubación del anticuerpo con otros péptidos en exceso (100 µg/ml) como la ACTH (11-19), -endorfina, -endorfina, -endorfina, -lipotropina, -MSH, -MSH, -MSH, metionina-encefalina, leucina-encefalina, -neo-endorfina, hormona liberadora de gonadotropina (GRH) o con dinorfina B, en todos los casos observamos reacción. Por lo tanto, el anticuerpo utilizado reconoce a la ACTH (1-39) y a la ACTH (18-39).

### **B. Metionina-encefalina**

Observamos marcaje cuando el anticuerpo anti -metionina-encefalina se incubó con un exceso (100 µg/ml) de beta-endorfina (1-31), alfa-endorfina, gamma-endorfina, beta-lipotropina, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), alfa-MSH, beta-MSH, gamma-MSH, leucina-encefalina, dinorfina A, alfa-neo-endorfina o de dinorfina B.

### **C. Sustancia P**

Observamos marcaje cuando el anticuerpo anti -sustancia P se incubó con un exceso (100 µg/ml) de neuroquinina A, neuroquinina B, eledoisina o con kas inina.

#### **D. Somatostatina-28 (1-12)**

Se apreció marcaje cuando la anti-somatostatina-28 (1-12) se incubó con un exceso (100 µg/ml) de somatostatina-28, somatostatina-14, neuropéptido-Y, neurotensina, angiotensina II, sustancia P, metionina-encefalina o con leucina-encefalina.

#### **E. -neo-endorfina**

Cuando la anti- -neo-endorfina fue incubada con un exceso (100 µg/ml) de dinorfina A (1-8), dinorfina A (1-17), dinorfina B, -neo-endorfina, -endorfina, metionina-encefalina o con leucina-encefalina, no observamos la pérdida de la reacción.

#### **F. -endorfina (1-27)**

Sí observamos reacción cuando el anticuerpo anti - -endorfina (1-27) se incubó con un exceso (100 µg/ml) de -endorfina (1-31) -endorfina, -endorfina, -lipotropina, hormona adrenocorticotropa (ACTH), -MSH, -MSH, -MSH, metionina-encefalina, leucina-encefalina, dinorfina A, -neo-endorfina o con dinorfina B.

#### **G. Neurotensina**

Preabsorción de anticuerpos con neurotensina (100 µg/ml de anticuerpos diluido). No se observó reacción. Si se apreció cuando la anti-neurotensina se incubó con sustancia P, angiotensina II, beta-endorfina, somatostatina y polipéptido intestinal vasoactivo.

## **2.5 Atlas estereotáxico**

Para destacar la distribución de péptidos en el tronco del encéfalo de la alpaca *Lama pacos*, 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). También, utilizamos los atlas de Berman (1968) (gato) y de Paxinos y Watson (1998) (rata). Para la nomenclatura de los núcleos del tronco de encéfalo de la alpaca, utilizamos esos mismos atlas.

## **2.6 Densidad de las fibras y de los somas inmunorreactivos**

Las densidades de las fibras inmunorreactivas que hemos observado se han dividido en muy alta, alta, moderada, baja o muy baja (unas pocas fibras). Para la determinación del grado de densidad, las densidades observadas se compararon en todo momento con fotos de referencia, tomadas al mismo aumento, a las que previamente fueron adjudicadas las cinco densidades mencionadas anteriormente (ver Marcos et al., 1999). El aumento al que se observaron las secciones tronco encefálicas, para determinar el grado de densidad de las fibras inmunorreactivas, fue el mismo al que se realizaron las fotos de referencia.

Las fibras inmunorreactivas fueron clasificadas de la siguiente forma, según su longitud: cortas (40-90 µm), medianas (91-120 µm) y largas (superiores a 120 µm) (ver Belda et al., 2000). Respecto a la densidad de los somas inmunorreactivos, hemos considerados una densidad alta cuando observamos más de 10 por sección; una densidad moderada cuando encontrado entre 5 y



10 somas por sección y una baja densidad cuando hemos encontrado menos de 5 somas por sección (ver Belda et al., 2000).

Finalmente, hemos considerado que los somas son pequeños cuando miden menos de 15  $\mu\text{m}$  de diámetro, medianos cuando su diámetro oscilaba entre 15 y 25  $\mu\text{m}$  y grandes si miden más de 25  $\mu\text{m}$  (ver Coveñas et al., 2001).

## **2.7 Técnicas morfológicas**

Hemos realizado una serie de técnicas morfológicas convencionales (hematoxilina-eosina; cresil violeta), para determinar los núcleos del tronco del encéfalo de la alpaca.

## **2.8 Obtención de la iconografía**

Las fotos fueron captadas con una cámara digital Olympus C-51 acoplada a un microscopio Kyowa Unilux. Después, se ajustó el brillo y contraste de las imágenes con el programa Adobe Photoshop CS3; en este mismo programa se realizó la composición de los núcleos y se insertaron los distintos símbolos explicativos.

Los esquemas fueron tomados del atlas de *Lama glama* (Llama), fueron escaneados con el programa HP Photosmart y redibujados en el programa Canvas 7. Además, se mantuvo la escala original para una óptima visualización de los resultados.

# **III. ABREVIATURAS**

<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

## A

<b>AP</b>	Área postrema
-----------	---------------

## B

<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

## C

<b>CAE</b>	Locus coeruleus
<b>CC</b>	Canal central
<b>CS</b>	Colículo Superior
<b>Cu</b>	Núcleo cuneatus
<b>Cx</b>	Núcleo cuneatus externo

## **D**

**DMV** Núcleo motor dorsal del vago  
**DRM** Núcleo dorsal de rafe

## **F**

**FRet** Formación reticular

## **G**

**Gr** Núcleo gracilis

## **I**

**IC** Colículo inferior  
**IO** Oliva inferior  
**IP** Núcleo interpeduncular

## **L**

**LRet** Núcleo reticular lateral  
**LM** Línea media

## **M**

**MLB** Tracto longitudinal medial

## N

- NR** Núcleo rojo
- NTS** Núcleo del tracto solitario

## **P**

<b>P</b>	Tracto piramidal
<b>PAG</b>	Sustancia gris periacueductal
<b>Ped</b>	Pedúnculo cerebral
<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

## **R**

<b>RB</b>	Cuerpo restiforme
-----------	-------------------

## **S**

<b>S</b>	Tracto solitario
<b>SN</b>	Sustancia negra
<b>SO</b>	Oliva superior

## **T**

<b>TB</b>	Cuerpo trapezoide
<b>TRC</b>	Núcleo reticular tegmental, división central

## **V**

<b>Ves</b>	Núcleo vestibular
------------	-------------------

# **IV-RESULTADOS**

## 4.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

Hemos estudiado en el tronco de encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*) la distribución de siete neuropéptidos (metionina-encefalina, sustancia P, ACTH (18-39), neurotensina, somatostatina-28 (1-12), -neo-endorfina y -endorfina (1-27)). De los núcleos/regiones que forman el tronco del encéfalo, hemos observado la presencia de estructuras inmunorreactivas en un total de 44 núcleos/regiones en el tronco del encéfalo de la alpaca (ver Tablas I, II y Gráfico 1).

### A. Somas

No hemos observados somas con sustancia P, ACTH, -endorfina (1-27) y -neo-endorfina, en el tronco del encéfalo de la alpaca, sin embargo sí hemos encontrado somas peptidérgicos con neurotensina, metionina-encefalina y somatostatina-28 (1-12). En todos los casos, los somas peptidérgicos fueron localizados en la protuberancia y en el bulbo raquídeo de la alpaca; no hemos observados somas peptidérgicos en la zona mesencefálica. Somas con metionina-encefalina fueron observados en 3 núcleos/regiones de los 35 en los que encontramos marcaje es decir en el 6,81% de los núcleos, somas con somatostatina-28 (1-12) en 2 núcleos/regiones de los 33 marcados (4,54%) y neurotensina en 3 de los 30 núcleos/regiones marcados (6,81%) (ver Tablas II, III y Gráfico 3). En 3 núcleos/regiones se ha observado una densidad baja de somas inmunorreactivos con metionina-encefalina; en 3 núcleos/regiones una densidad baja de somas con neurotensina; en 1 núcleo/región encontramos una densidad moderada de somas con somatostatina y en dos de ellos una densidad baja (ver Tabla IV, Gráficos 1 y 5).

### B. Fibras



Hemos observado fibras peptidérgicas conteniendo los siete neuropéptidos estudiados en el tronco del encéfalo de la alpaca. En el caso de la metionina-encefalina hemos encontrado fibras inmunorreactivas en 35 de los 44 núcleos/regiones en tronco del encéfalo (79,54%), fibras con sustancia P en 34 de los 44 núcleos/regiones (77,27%), fibras con ACTH (18-39) en 31 núcleos/regiones (70,45%), fibras con neurotensina en 30 núcleos/regiones (68,18%), fibras con somatostatina-28 (1-12) en 33 núcleos/regiones (75,00%), fibras con  $\beta$ -neo-endorfina en 29 núcleos/regiones (65,90%) y fibras con  $\beta$ -endorfina en 26 núcleos/regiones (59,09%) (ver Tablas I-III y Gráficos 1 y 2).

## **4.2. Distribución de $\alpha$ -neo-endorfina en el tronco del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*)**

En los 44 núcleos estudiados del tronco del encéfalo de la alpaca hemos observado 29 núcleos con fibras marcada con  $\alpha$ -neo-endorfina y ningún núcleo con somas (Tabla I). En la Figura 1 se aprecia la distribución de las estructuras inmuno reactivas que contienen  $\alpha$ -neo-endorfina en el tronco del encéfalo de la alpaca. Observamos fibras con  $\alpha$ -neo-endorfina en el colículo superior, núcleo interpeduncular (ver Figuras 1A-C), pedúnculo cerebral, sustancia negra (ver Figura 1A), sustancia gris periacueductal (ver Figuras 1A-C, 2L), formación reticular mesencefálica, protuberancial y bulbar (ver Figuras 1A-I, 2B-G, J), núcleo rojo (ver Figuras 1A, B), tracto piramidal (ver Figura 1D-F), locus coeruleus, núcleo reticular tegmental (división central) (ver Figuras 1D), oliva superior (ver Figura 1E, 2H), brachium conjunctivum, núcleo lateral del brachium conjunctivum, (ver Figuras 1D, E), línea media (ver Figuras 1A-I, 2I), área postrema (ver Figura 1H), oliva inferior (ver Figura 1G, H), núcleo cuneatus, núcleo gracilis (ver Figuras 1H, I), tracto trigémino espinal ( Figuras 1E-I, 2K), núcleo reticular lateral (ver Figura 1I), núcleo vestibular, cuerpo restiforme, núcleo espinal alaminar del trigémino, división parvocelular (ver Figura 1F), núcleo facial (división lateral y medial) (ver Figuras 1F, 2A), cuerpo trapezoide (ver Figura 1E), núcleo espinal del trigémino (ver Figuras 1H, I), núcleo del tracto solitario y tracto solitario (ver Figura 1G), (ver Tabla I).

### **4.3. Distribución de $\beta$ -endorfina (1-27) en el tronco del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*)**

No observamos somas inmunorreactivos con el neuropéptido  $\beta$ -endorfina en el tronco del encéfalo de *Lamas pacos*.

Hemos localizado fibras con  $\beta$ -endorfina en colículo superior (ver Figuras 3A-D), núcleo rojo (ver Figura 3A), núcleo troclear (ver Figura 3B), formación reticular mesencefálica, protuberancial y bulbar (ver Figuras 3A-I, 4B, E, F, H, I, K), núcleo interpeduncular, (ver Figuras 3A, C), colículo inferior y en la sustancia gris de la protuberancia división medial, (ver Figura 3D), sustancia gris periacueductal, (ver Figuras 3A-D, 4A, D) área postrema, núcleo cuneatus ( ver Figura 3I), oliva superior, cuerpo trapezoide (ver Figura 3E), núcleo e spinal del trigémino (ver Figura 3J). También observamos fibras en el núcleo cuneatus externo, núcleo del tracto solitario, núcleo hipogloso, (ver Figura 3H), núcleo gracilis, (ver Figuras 3I, J), tracto trigémino espinal, (ver Figuras 3E-J), línea media (ver Figuras 3A-J, 4C, G, J, L), en el tracto piramidal (ver Figuras 3D, E), tracto solitario (ver figura 3G). Encontramos fibras con  $\beta$ -endorfina en el cuerpo restiforme, núcleo vestibular, núcleo facial (división medial y lateral) (ver Figura 3F) y oliva inferior (ver Figuras 3G-J), (ver Tabla I).

#### **4.4. Distribución de sustancia P en el tronco del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*)**

Hemos observado fibras con sustancia P en el colículo superior, núcleo interpeduncular ( ver Figuras 5A-C), sustancia gris periacueductal ( ver Figuras 5A-D, 6G, H), núcleo rojo ( ver Figuras 5A, B), pedúnculo cerebral, sustancia negra ( ver Figura 5A), núcleo troclear ( ver Figura 5B), línea media ( ver Figuras 5A-I) y formación reticular mesencefálica, protuberancial y bulbar ( ver Figuras 5A-I, 6B, F). Además, observamos fibras marcadas con sustancia P en el colículo inferior, sustancia gris de la protuberancia (división lateral y medial) ( ver Figuras 5C, D), núcleo dorsal de rafe (5C), tracto piramidal ( ver Figuras 5C, E, F), oliva superior, cuerpo trapezoide, núcleo motor del trigémino ( ver Figura 5E), núcleo vestibular, genu del nervio facial, núcleo facial (división lateral y medial) ( ver Figura 5F), núcleo espinal alaminar del trigémino (división parvocelular) ( ver Figuras 5G, 6C, I), núcleo cuneatus externo, núcleo del tracto solitario, tracto solitario, núcleo motor dorsal del vago, ( ver Figura 5G), cuerpo restiforme ( ver Figuras 5F, 6D), oliva inferior ( ver Figuras 5G-I), núcleo gracilis, núcleo cuneatus, núcleo reticular lateral y ( ver Figuras 5H-I) en el núcleo espinal del trigémino ( ver Figuras 5H, I 6A) y tracto trigémino espinal ( ver Figuras 5E-I, 6E) ( ver Tabla I).

## **4.5 Distribución de metionina-encefalina en el tronco del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*)**

Hemos encontrado somas marcadas con metionina-encefalina en la línea media bulbar, en la formación reticular bulbar y en el núcleo del cuerpo trapezoide (ver Figuras 7E, 8C, D, G). Observamos fibras marcadas con metionina-encefalina en el colículo superior (ver Figuras 7A-D), núcleo rojo (ver Figuras 7A, B), núcleo interpeduncular (ver Figuras 7A, C), línea media mesencefálica, protuberancia y bulbar (ver Figuras 7A-J, 8C), sustancia gris periacueductal (ver Figuras 7A-D, 8H, I), formación reticular mesencefálica, protuberancia y bulbar (ver Figuras 7A-J, 8A, B, E, F, K, L), oliva superior, núcleo marginal del brachium conjunctivum (división lateral y medial), núcleo motor del trigémino, cuerpo trapezoide (ver Figura 7E), núcleo vestibular, núcleo facial (división lateral y medial), genu del nervio facial (ver Figura 7F), núcleo troclear (ver Figura 7B), sustancia negra (ver Figura 7A). Además, fibras con metionina-encefalina fueron observadas en el tracto trigémino espinal (ver Figuras 7E, 7F, 7I, 7J), tracto piramidal (ver Figuras 7C, 7D), núcleo cuneatus externo, núcleo del tracto solitario, núcleo hipogloso (ver Figura 7H), núcleo espinal alaminar del trigémino (división parvocelular) (ver Figuras 7F-H, 8J), área postrema (ver Figura 7I), núcleo cuneatus, núcleo gracilis, núcleo motor dorsal del vago, núcleo espinal del trigémino, núcleo reticular lateral (Figuras 7I, 7J), cuerpo restiforme (ver Figura 7F, 7G), sustancia gris de la protuberancia (división medial), colículo inferior (ver Figura 7D), núcleo dorsal de rafe (ver Figura 7D), tracto solitario (ver Figuras 7G, H) y oliva inferior (ver Figura 7H-J), (ver Tabla I).

#### **4.6. Distribución de somatostatina-28 (1-12) en el tronco del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*)**

Hemos localizado cuerpo celulares inmunomarcados con somatostatina-28 (1-12) en la formación reticular del bulbo raquídeo y en la línea media del bulbo raquídeo (ver Figuras 9G-I, 10B, C). Con este neuropéptido observamos fibras inmunorreactivas en el colículo superior (ver Figuras 9A-C, 10E, G, K), núcleo rojo (ver Figuras 9A-B), formación reticular mesencefálica, protuberancial y bulbar (ver Figuras 9A-J, 10A-D,J), línea media (Figuras 9A-J), núcleo interpeduncular (ver Figura 9C), tracto longitudinal medial (Figuras 9D,10H), sustancia gris periacueductal (Figuras 9A-C, 10F, L), sustancia negra (ver Figura 9A), oliva superior, cuerpo trapezoide (ver Figuras 9E, 10I), núcleo brachium conjunctivum (medial y lateral) (ver Figuras 9D, E), cuerpo restiforme, núcleo vestibular (Figuras 9F, G), núcleo espinal alaminar del trigémino (división parvocelular) (ver Figuras 9F, H), tracto trigémino espinal (ver Figuras 9F-J), núcleo cuneatus externo, núcleo del tracto solitario y tracto solitario (ver Figura 9H), núcleo reticular lateral, núcleo cuneatus, núcleo gracilis, (ver Figuras 9I-J), oliva inferior (ver Figura 9G-J), locus coeruleus, núcleo reticular tegmental (división central), divisiones medial y lateral de la sustancia gris de la protuberancia (ver Figura 9D), núcleo facial (divisiones lateral y medial) (ver Figura 9F), área postrema (ver Figura 9I), núcleo espinal del trigémino (ver Figura 9J) y en el tracto piramidal (ver Figuras 9D-G) (ver Tabla I).

#### **4.7. Distribución de hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en el tronco del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*).**

No hemos observado somas inmunorreactivas con hormona adrenocorticotrópica (ACTH). Localizamos fibras con ACTH en el colículo superior (ver Figuras 11A-D, 12I-J), núcleo rojo, (ver Figuras 11A, 11B), sustancia negra (ver Figura 11A), núcleo interpeduncular (ver Figuras 11A-C), núcleo troclear (ver Figura 11B), formación reticular mesencefálica, protuberancia l y bulbar (ver Figuras 11A-J, 12E, F, K), tracto piramidal (ver Figuras 11D, E), línea media mesencefálica, protuberancial y bulbar (ver Figuras 11A-J, 12C, D, G), tracto trigémino espinal (ver Figura 11E-G, I), núcleo motor del trigémino, oliva superior, núcleo del cuerpo trapezoide, brachium conjunctivum lateral (ver Figura 11E), núcleo facial (divisiones medial y lateral) (ver Figuras 11F, 12L), división parvocelular del núcleo espinal alaminar del trigémino (ver Figuras 11F, 11H), núcleo del tracto solitario, núcleo cuneatus externo, núcleo hipogloso (ver Figura 11H), oliva inferior (ver Figuras 11G- J), núcleo gracilis, núcleo cuneatus, núcleo espinal del trigémino (ver Figuras 11I, J), área postrema (ver Figura 11I), sustancia gris periacueductal (ver Figuras 11A-D, 12H), colículo inferior, sustancia gris de la protuberancia (división medial) (ver Figuras 11C, D), núcleo vestibular (ver Figuras 11F, 12A, B), cuerpo restiforme (ver Figura 11G) y tracto solitario (ver Figuras 11G, 11H) (ver Tabla I).

#### **4.8. Distribución de neurotensina en el tronco del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*)**

La distribución de las fibras inmunorreactivas con neurotensina en el tronco del encéfalo de la alpaca se observa en la Figura 13A-J. Hemos encontrados una densidad baja de somas inmunorreactivos en la línea media bulbar, formación reticular bulbar y en la área postrema (ver Figuras 13H, 14C), Observamos fibras con neurotensina en el colículo superior, sustancia gris periacueductal (ver Figuras 13A-C), núcleo rojo (ver Figuras 13A, B), sustancia negra (ver Figuras 13A, 14G) formación reticular mesencefálica, protuberancial y bulbar (ver Figuras 13A-J, 14A, B, D-F, H), núcleo interpeduncular (ver Figuras 13B, C), locus coeruleus, tracto longitudinal medial, núcleo reticular tegmental (división central), núcleo del brachium conjunctivum (divisiones medial y lateral), sustancia gris de la protuberancia (divisiones lateral y medial ) (ver Figura 13D), núcleo vestibular, genu del nervio facial, núcleo facial, (división medial y lateral) (ver Figura 13E), oliva inferior (ver Figuras 13F-J), núcleo cuneatus externo, núcleo del tracto solitario (ver Figura 13G), núcleo reticular lateral (ver Figura 13I), área postrema (ver Figura 13H), núcleo gracilis, núcleo espinal del trigémino, núcleo cuneatus (ver Figuras 13H-J), núcleo espinal alaminar del trigémino (división parvocelular) ( ver Figuras 13E-G), tracto trigémino espinal (ver Figuras 13E-I), línea media (ver Figuras 13A-J) y núcleo praepositus hypoglossi (ver Figura 13F) (ver Tabla I).



# **V. TABLAS Y GRÁFICOS DE LOS RESULTADOS**

**TABLA I: Distribución de neuropéptidos en el tronco del encéfalo de la alpaca**

Núcleo	Met-5		SP		ACTH		NT		SOM		-neo-end		-end		
	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	
<b>4</b>	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
<b>5M</b>	++	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5SL</b>	+	-	+	-	+	-	+/+++	-	+/+++	-	+	-	+	-	-
<b>5SP</b>	+/+++	-	+	-	+	-	++	-	+	-	+	-	-	-	-
<b>5ST</b>	+/+++	-	++	-	+	-	+/+++	-	+/+++	-	+/+++	-	+	-	-
<b>7G</b>	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>7L</b>	++	-	++	-	+	-	+	-	+	-	++	-	+	-	-
<b>7M</b>	++	-	++	-	+	-	+	-	++	-	++	-	+	-	-
<b>12</b>	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<b>AP</b>	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
<b>BC</b>	-	-	-	-	-	-	++	-	+/+++	-	+	-	-	-	-
<b>BCL</b>	++	-	-	-	+	-	+	-	+/+++	-	++	-	-	-	-
<b>BCM</b>	++	-	-	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-	-	-
<b>CAE</b>	-	-	-	-	-	-	+	-	++	-	+	-	-	-	-
<b>CC</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>CS</b>	+/+++	-	+	-	+/+++	-	+/+++	-	+	-	+	-	+/+++	-	-
<b>Cu</b>	+	-	+	-	+	-	++	-	+	-	+/+++	-	+	-	-
<b>CX</b>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
<b>DMV</b>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>DRM</b>	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>FRet</b>	+/+++/ +++	+	+/+++	-	+/	-	+/+++	+	+/+++	+/	+/+++/ +++	-	+/+++	-	-
<b>Gr</b>	++	-	+	-	+	-	+/+++	-	+	-	+	-	+	-	-
<b>IC</b>	++	-	+	-	+/+++	-	-	-	-	-	-	-	+/+++	-	-
<b>IO</b>	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-
<b>IP</b>	+	-	+	-	+/+++	-	+/+++	-	+	-	+	-	+/+++	-	-
<b>LM</b>	+/+++	+	+	-	+/+++ /+++	-	++	+	+/+++	+	+	-	+	-	-
<b>Lret</b>	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
<b>MLB</b>	-	-	-	-	-	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-
<b>NR</b>	+	-	+	-	+	-	+/+++	-	+	-	+	-	+	-	-

**TABLA I. Distribución de neuropéptidos en el tronco del encéfalo de la alpaca**

Núcleo	Met-5		SP		ACTH		NT		SOM		-neo-end		-end	
	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S
NTS	+		+	-	+	-	++	-	++	-	+	-	+	-
P	+/+++	-	+/+++		+	-	-	-	+/+++	-	+	-	+	-
PAG	+/+++/ +++	-	+/+++	-	+/+++/ +++	-	++	-	+/+++	-	+	-	+/+++	-
Ped	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PG	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PGL	-	-	+	-	-	-	+/+++	-	+/+++	-	-	-	-	-
PGM	+	-	+	-	+	-	+/+++	-	++	-	-	-	+	-
PH	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
RB	+	-	+	-	+	-	-		+	-	+	-	+	-
S	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	++	-	+	-
SN	+/+++	-	+	-	+	-	++/ +++	-	+/+++	-	+	-	-	-
SO	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
TB	++	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
TRC	-	-	-	-	-	-	++	-	+/+++	-	+	-	-	-
Ves	+	-	+	-	+	-	+/+++	-	+	-	+	-	+	-

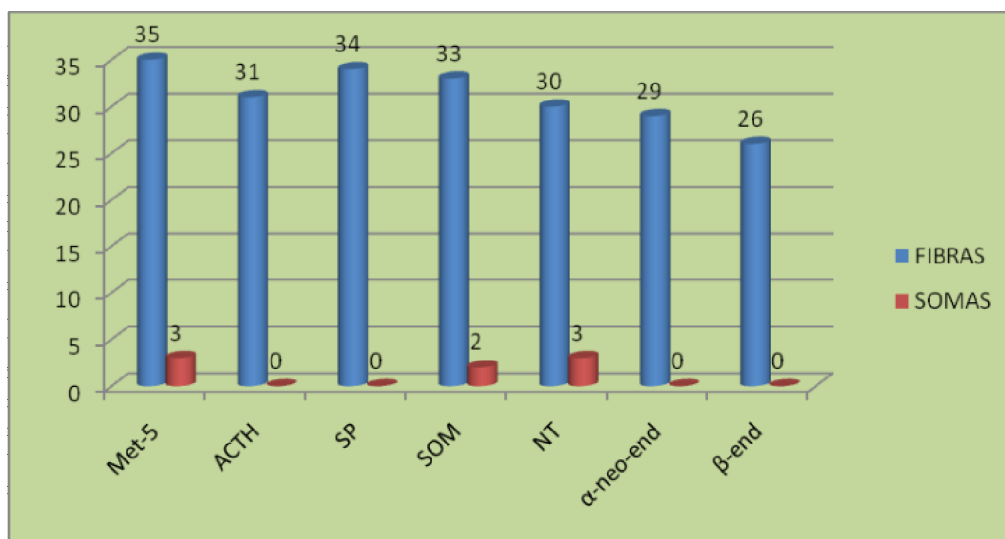
**F:** fibras (+++: alta densidad; ++: densidad moderada; +: baja densidad). **S:** somas (+++: alta densidad; ++: densidad moderada; +: baja densidad). **ACTH:** hormona adrenocorticotrópica; **NT:** neurotensina; **SOM:** somatostatina-28 (1-12); **MET-5:** metionina-encefalina; **-NEO:** alfa-neo-endorfina; **-end:** beta-endorfina (1-27); **SP:** Sustancia P. Ver la lista de abreviaturas para la nomenclatura de los núcleos del tronco del encéfalo de la alpaca.

**TABLA II. Número de núcleos con inmunorreactividad en el tronco del encéfalo de la alpaca**

<b>Neuropéptidos</b>	<b>Fibras</b>	<b>Somas</b>
<b>MET-5</b>	<b>35</b>	<b>3</b>
<b>ACTH</b>	<b>31</b>	<b>0</b>
<b>SP</b>	<b>34</b>	<b>0</b>
<b>SOM</b>	<b>33</b>	<b>2</b>
<b>NT</b>	<b>30</b>	<b>3</b>
<b>-neo-end</b>	<b>29</b>	<b>0</b>
<b>-end</b>	<b>26</b>	<b>0</b>

Se indica el número de núcleos que presenta somas o fibras peptidérgicas en el tronco del encéfalo de la alpaca. Número total de núcleos: 44.

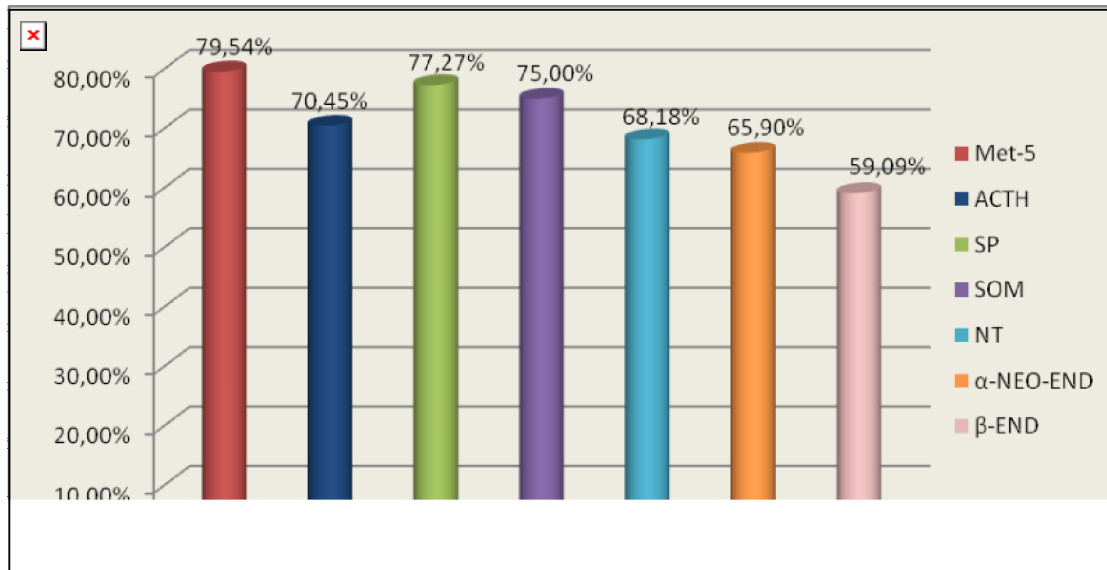
**Gráfico 1. Número de núcleos en el tronco del encéfalo de la alpaca con inmunorreactividad**



**TABLA III. Porcentaje de los núcleos en tronco del encéfalo de la alpaca que presentan inmunorreactividad. Número total de núcleos: 44**

Neuropéptidos	Fibras	Somas
<b>MET-5</b>	79,54%	6,81%
<b>ACTH</b>	70,45%	0,00%
<b>SP</b>	77,27%	0,00%
<b>SOM</b>	75,00%	4,54%
<b>NT</b>	68,18%	6,81%
<b>-neo-end</b>	65,90%	0,00%
<b>-end</b>	59,09%	0,00%

**Gráfico 2. Porcentaje de los núcleos del tronco del encéfalo de la alpaca que presentan inmunorreactividad para fibras.**



**Gráfico 3. Porcentaje de los núcleos del tronco del encéfalo de la alpaca que presentan inmunorreactividad para somas**



**Tabla IV. Indica el número de núcleos del tronco de encéfalo de la alpaca en donde hemos observado una alta, moderada o baja densidad de somas (S) y fibras (F) inmunor reactivas. En algunas regiones (por ejemplo en la formación reticular) hemos observado tres densidades para las fibras (baja, moderada y alta). Por esta razón, el número total de núcleos que aparece en la Tabla IV, puede no coincidir con el número total de núcleos que aparece en la Tabla II.**

Densidad	Met-5		ACTH		SP		SOM		NT		-neo- endorfina		-END	
	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S	F	S
<b>ALTA</b>	2	0	3	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
<b>MODERADA</b>	16	0	5	0	7	0	16	1	19	0	7	0	5	0
<b>BAJA</b>	27	3	31	0	30	0	28	1	20	3	25	0	26	0

**Gráfico 4. Representación gráfica de los datos indicados en a Tabla IV.**

**Densidad de la Inmunorreactividad (Fibras)**



**Gráfico 5. Representación gráfica de los datos indicados en la Tabla IV.**

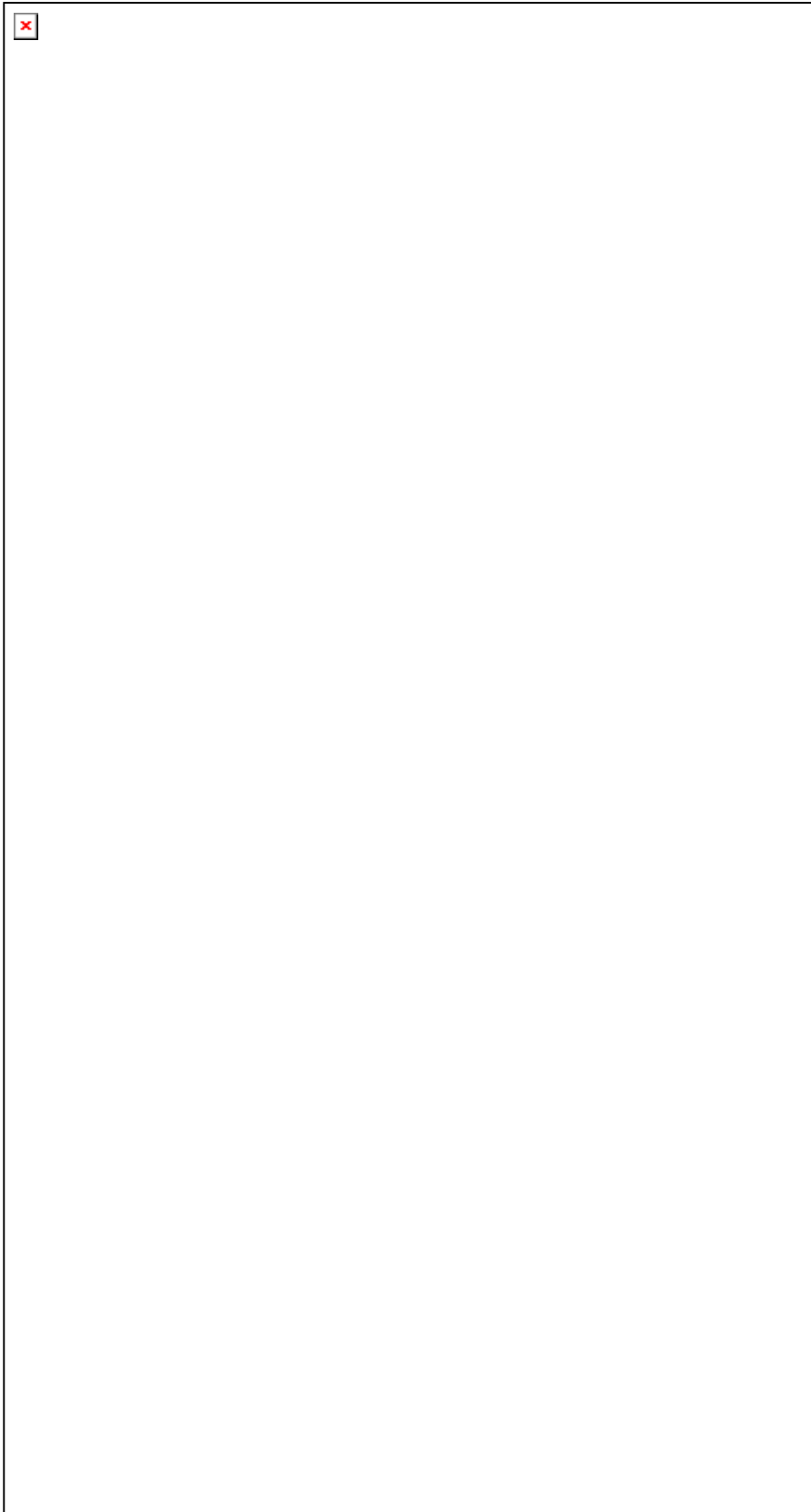
**Densidad de la Inmunorreactividad (Somas )**

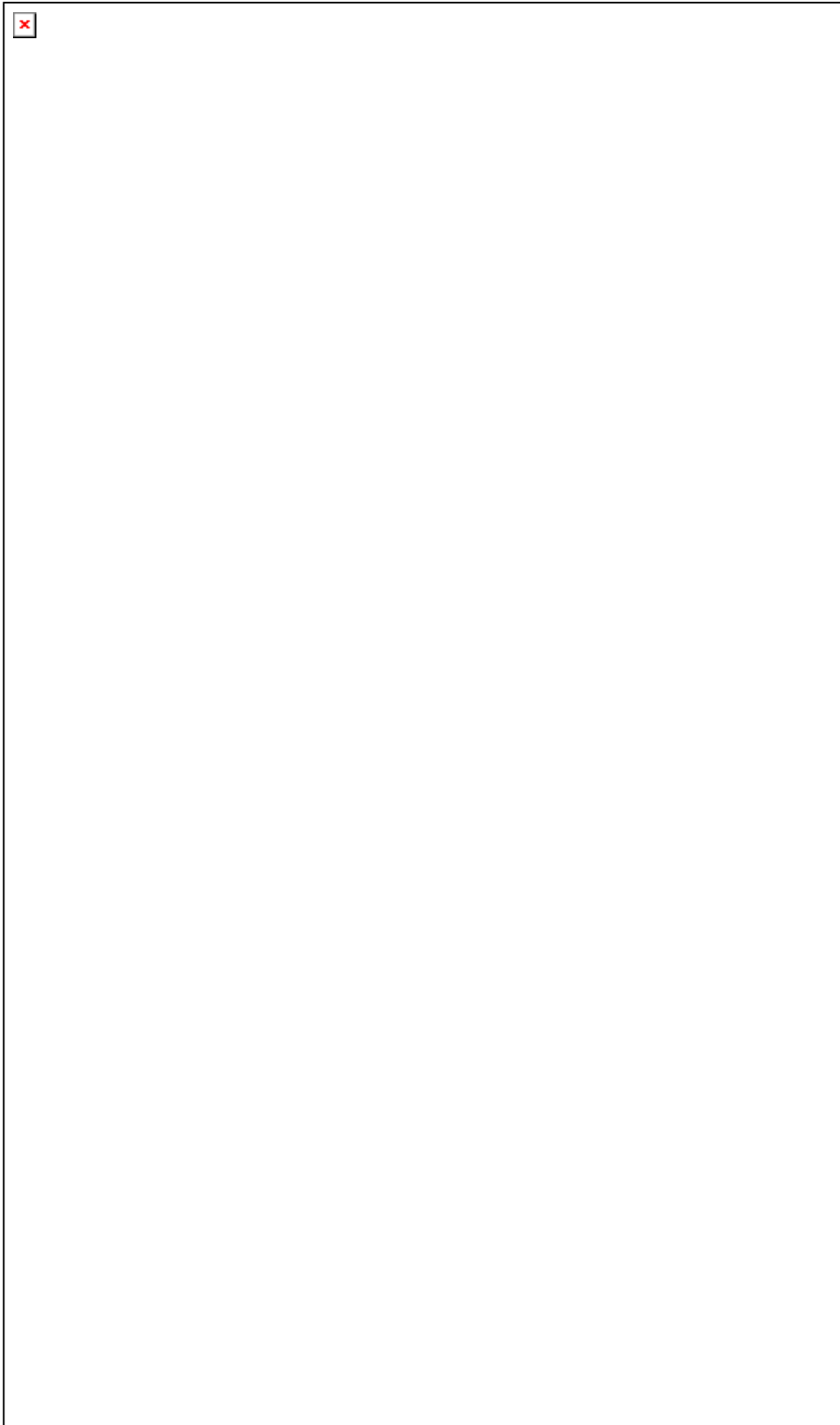


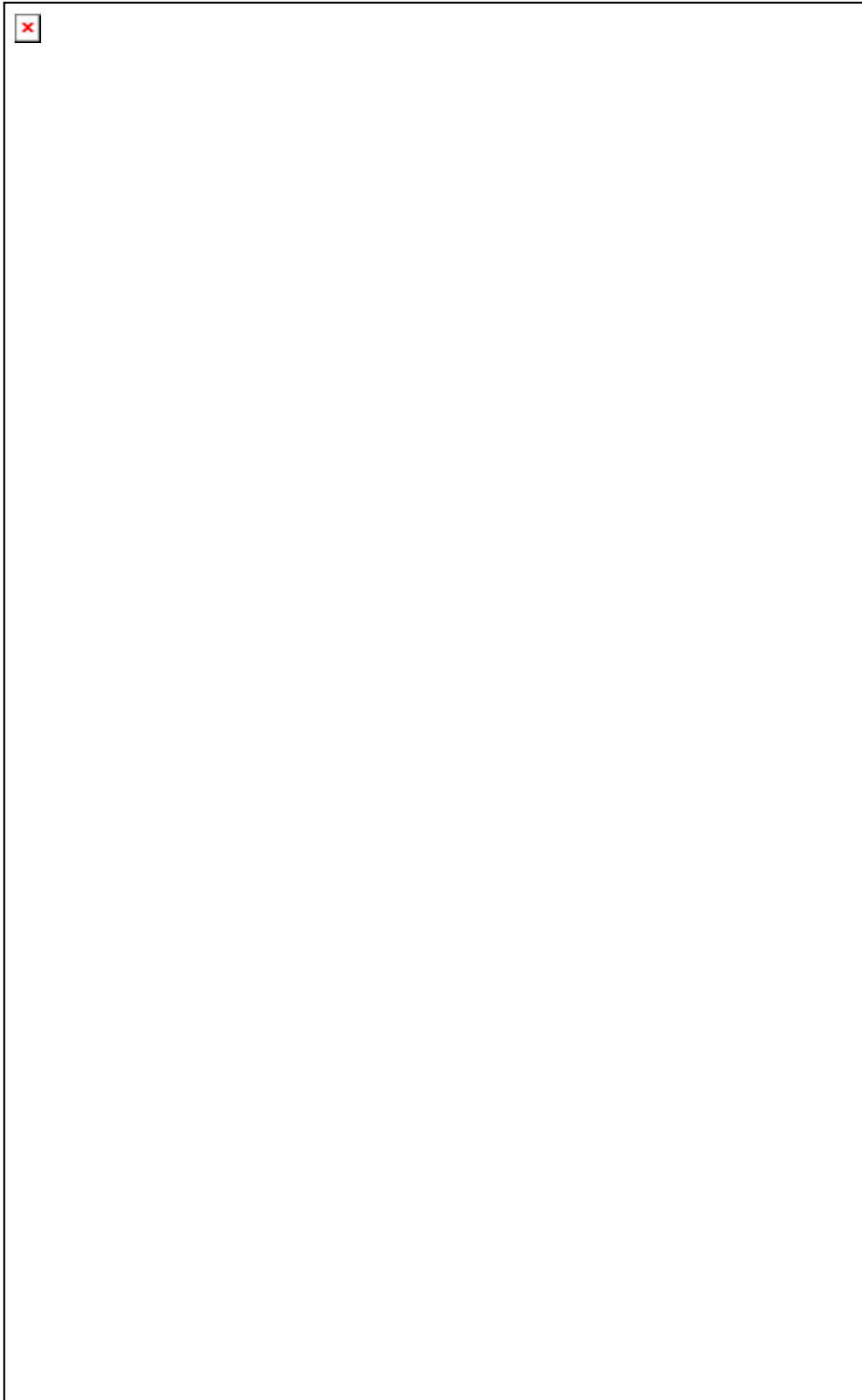


# **VI. ICONOGRAFÍA**

**Figura 1.** Esquemas de la distribución de fibras con  $\beta$ -neo-endorfina en secciones frontales del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*) desde regiones rostrales (**A**) a caudales (**I**). Las fibras están representadas por líneas varicosas (escasas fibras o densidad baja), líneas continuas (densidad moderada) y líneas cruzadas (densidad alta). Para las abreviaturas: ver lista de abreviaturas.







**Figura 2.** Fibras inmunorreactivas con  $\beta$ -neo-endorfina en el tronco del encefálo de la alpaca. Entre paréntesis se indican las figuras, por lo tanto los niveles correspondientes, a partir de los cuales se tomaron las fotos. Barra: 50  $\mu$ m.

A- Fibras localizadas en el núcleo facial (7M) (Figura 1F).

B, C- Fibras en la formación reticular del bulbo raquídeo (FRet) (Figura 1H).

D- Fibras en la formación reticular de la protuberancia (FRet) (Figura 1D).

E- Fibras en la formación reticular bulbar (FRet) (Figura 1I).

F- Fibras en la formación reticular bulbar (FRet) (Figura 1I).

G- Fibras en la formación reticular mesencefálica (FRet) (Figura 1B).

H- Fibras en el núcleo de la oliva superior (SO) (Figura 1E).

I- Fibras en la línea media del bulbo raquídeo (LM) (Figura 1G).

J- Fibras en la formación reticular bulbar (Figura 1I).

K- Fibras en el tracto trigémino espinal (5ST) (Figura 1F).

L- Fibras en la sustancia gris periacueductal (PAG) (Figura 1A).







**Figura 3.** Distribución de fibras con  $\beta$ -endorfina en secciones frontales del tronco del encéfalo de la alpaca (*Lama pacos*) desde regiones rostrales (**A**) a caudales (**J**). Las fibras están representadas por líneas varicosas (escasas fibras o baja densidad), líneas continuas (densidad moderada) y líneas cruzadas (densidad alta). Para las abreviaturas: ver lista de abreviaturas.

