

DISTRIBUCIÓN DE LA METENCEFALINA EN LA VÍA ÓPTICA. ESTUDIO EXPERIMENTAL INMUNOCITOQUÍMICO

DISTRIBUTION OF MET-ENKEPHALIN EXPRESSION IN THE VISUAL PATHWAY. EXPERIMENTAL STUDY BY IMMUNOCYTOCHEMISTRY

MONTERO-DE-ESPINOSA I¹, MÁRQUEZ-DE-ARACENA R¹, MUÑOZ-SAEZ M¹

RESUMEN

Objetivo: Conocer la localización y distribución de neuropéptidos en la vía óptica, concretamente, la determinación de inmunorreactividad a met-enkefalina, clave para la funcionalidad de dicha vía.

Método: Se analizó la vía óptica de ocho gatos. Tras extracción quirúrgica; cortes con microqueratomo y procesamiento mediante inmunocitoquímica indirecta, utilizando como anticuerpo la anti-metencefalina, con el fin de detectar la presencia o ausencia del pentapéptido en la vía óptica del gato.

Resultados: Se detectaron receptores a met-enkefalina en áreas del encéfalo tanto corticales como subcorticales. Así, se considera la posible implicación de dicho pentapéptido en la funcionalidad de la vía óptica.

Conclusiones: La presencia de receptores a met-enkefalina en áreas del encéfalo tanto corticales como subcorticales, muestra la posible implicación de dicho neurotransmisor en la funcionalidad de la vía óptica.

Palabras clave: Sustancia P, vía óptica, neurotransmisor, neuroprotección.

ABSTRACT

Purpose: The localization and distribution of neuropeptide expression in the cat visual pathway can provide information about the function of that pathway.

Method: Study of optic pathway in eight cats. Following extraction of the brain, slices were prepared using a microkeratome. The slices were examined by indirect immunocytochemistry using anti-met-enkephalin as antibody to determine the presence or absence of this pentapeptide in the visual pathway.

Results: Met-enkephalin receptors in both cortical and subcortical regions of the brain were detected. This suggests that met-enkephalin could be involved in the visual mechanism.

Conclusions: The presence of met-enkephalin receptors in both cortical and subcortical regions of the brain suggests that this pentapeptide could be involved in the visual mechanism (*Arch Soc Esp Ophthalmol 2009; 84: 245-250*).

Key words: Substance P, optic nerve, visual pathway, neurotransmitter, neuroprotection.

Recibido: 31/5/07. Aceptado: 12/5/09.

Servicio de Oftalmología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla. España.

¹ Doctor en Medicina.

Correspondencia:

Ignacio Montero de Espinosa

Docencia Pregrado. Edificio de Gobierno

Hospital Universitario Virgen del Rocío

C/. Manuel Siurot, s/n

41013 Sevilla

España

E-mail: eignacio.montero.sspa@juntadeandalucia.es / maria96@supercable.es

INTRODUCCIÓN

Hace más de treinta años que se conocen los neuropéptidos y con ellos la neuromodulación. Estos no sólo liberan hormonas a la sangre, sino también forman sinapsis sobre la superficie de otras células. Los péptidos reúnen una serie de características que les diferencian de los neurotransmisores clásicos, como la activación de los receptores a concentraciones mucho más bajas y una duración mucho mayor que los neurotransmisores convencionales (1). Se caracterizan por la coexistencia: una misma sinapsis puede liberar dos o más neurotransmisores (peptídico y clásico) al mismo tiempo (1-3); y la co-transmisión: regulación de un neurotransmisor peptídico o clásico por otro de naturaleza peptídica (4). Hasta ahora se han descrito más de 50 neuropéptidos, realizándose varias clasificaciones de los mismos.

La metionina-enkefalina fue uno de los primeros opiáceos endógenos que se aisló, con propiedades analgésicas y euforizantes tipo morfina. Se caracteriza por su alta selectividad y estereoespecificidad (5). Cualquier cambio estructural la inactiva y pueden actuar como antagonistas opiáceos. Existe un elevado número de receptores en los vertebrados (4).

El mapa de distribución del receptor opiáceo en el cerebro coincide con la vía paleo-espinotalámica del dolor, encontrándose también en la amígdala, cuerpo estriado e hipotálamo. La variabilidad de localizaciones coincide con la diversidad de funciones. Su distribución coincide bastante con la de los receptores opiáceos tanto exógenos como endógenos, principalmente la enkefalina. Los receptores opiáceos se dividen en receptores μ , a su vez subdivididos en receptores delta y kappa (6).

La presencia de receptores para opiáceos en el cerebro hizo pensar que dichos receptores serían utilizados por determinadas sustancias endógenas, demostrándose la presencia de enkefalinas en ratas (7). Posteriormente, se pudo comprobar que son neurotransmisores de sistemas neuronales específicos, localizados en el cerebro, que participan en la integración de la información sensorial relacionada con el dolor y el comportamiento emocional (8).

Los péptidos opiáceos derivan de la proopiomelanocortina (POMC), proenkefalina (de la que deriva la met-enkefalina) y de la prodinorfina (9).

La metencefalina es una molécula que actúa como neurotransmisor; es asimismo un neuromodulador, pues modula la acción de neurotransmisores clásicos mediante el fenómeno histológico de coe-

xistencia y fisiológico de cotransmisión (1). También actúa como hormona (a distancia) teniendo actividad neuroendocrina, ya que actúa sobre la hipófisis modificando la liberación de algunas hormonas: estimulan la secreción de ACTH, GH y prolactina en el lóbulo anterior, de MSH en el intermedio y de ADH en el posterior; mientras que inhiben la secreción de TSH, LH y FSH. Así pues, basándonos en esta multifuncionalidad podemos considerar la metencefalina como una molécula con capacidad para interconectar diferentes sistemas cerebrales.

La metencefalina está implicada en diferentes comportamientos y fenómenos fisiológicos que comprenden desde la percepción y modulación del dolor a la respuesta al stress, aprendizaje, balance energético, actividad motora, alimentación, conducta sexual, sueño y regulación térmica y respiratoria (4,12,15).

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizó el quirófano experimental y animalario de nuestro centro.

Recurso experimental: Se utilizaron ocho gatos machos adultos de un peso comprendido entre 2,5-4 kg.

Material de laboratorio y biológico: Anticuerpo 1 (anti-metionina enkefalina); anticuerpo 2 (anti Ig H+L de conejo unido a una peroxidasa); suero normal de carnero.

Material químico: suero fisiológico, paraformaldehído, tampón Sørensen, sacarosa, agua destilada, agua oxigenada, ácido clorhídrico, hidroximetilamino-metano (TRIS), tritón X-100, diaminobencidina (D.A.B.), glicerina.

Material de microscopía óptica, fotográfico y cartográfico (mapa del sistema nervioso central -SNC- del gato de Reinoso, F.).

Sobre ocho gatos se procedió, previa anestesia con ketamina, al abordaje quirúrgico del ventrículo izquierdo. Se efectuaron cortes de los globos oculares y de la masa encefálica (de un grosor aproximado de 80 micras) mediante un microqueratomo de congelación. Los cortes se efectuaron en base a un sistema estereotáxico centrado por un plano horizontal que contiene a ambos ejes tragoinfraorbitarios y por un plano coronal o frontal que porta el eje biauditivo, siendo el punto medio referido eje 0 estereotáxico del sistema, y el plano que lo contiene el plano 0.

Se procesaron mediante inmunocitoquímica indirecta, utilizando como anticuerpo la anti-metence-

falina con el fin de detectar la presencia o ausencia del pentapéptido.

Tras el revelado de la muestra con D.A.B. se lleva a cabo el montaje de las mismas y se realizó una clasificación por regiones.

La presencia de inmunorreactividad observada a nivel de las estructuras anatómicas se objetivaron mediante microscopio óptico y una vez determinada la localización e intensidad de la inmunorreactividad, extrapolamos los resultados a los mapas topográficos del SNC del gato de Reinoso (11), teniendo en cuenta que 1 cm en el mapa corresponde a 1 mm. En ella se reflejan 50 cortes desde 30 en los anteriores (A+30) hasta 20 en los posteriores (P-20), se representaron sólo los cortes en que se halló alguna inmunorreactividad (A+15 a P-10).

RESULTADOS

Los hallazgos inmunorreactivos fueron clasificados dependiendo de su intensidad: Baja, Moderada e Intensa.

Se han encontrado una inmunorreactividad baja en el cuerpo geniculado lateral, en el pulvinar, preteectum y corteza cerebral áreas 17, 18 y 19 (tabla I).

La intensidad ascendió a moderada en el colículo superior y en los estratos grises superficial, medio y profundo (tabla II).

No se encontró inmunorreactividad en las demás áreas de la vía óptica.

DISCUSIÓN

Se utilizó el gato como animal de experimentación por disponer de unos mapas cartográficos muy completos de este animal (9).

Se han descritos mapas cartográficos del cerebro de este mismo pentapéptido en el cerebro de distintos animales gracias a las técnicas de inmunocitoquímica, la misma que hemos utilizado en este estudio: en ratas (10), gatos, monos y humanos.

Es en el núcleo estriado, concretamente en el globus pallidus, donde se concentran las más altas den-

Tabla I. Inmunorreactividad a met-enkefalina en la vía óptica del gato

Inmunorreactividad	Moderada	Baja	Nula
Anterioridad A+15		Corteza: Áreas 18 y 19	Q.O.
Anterioridad A+14		Corteza: Áreas 18 y 19	Q.O.
Anterioridad A+13		Corteza: Áreas 18 y 19	T.O.
Anterioridad A+12		Corteza: Áreas 18 y 19	T.O.
Anterioridad A+11		Corteza: Áreas 18 y 19	T.O.
Anterioridad A+10		Corteza: Áreas 18 y 19	T.O.
Anterioridad A+9		Corteza: Áreas 18 y 19	T.O.
Anterioridad A+8		Corteza: Áreas 18-19, G.L., P.	R.O., G.M, T.O.
Anterioridad A+7		C.: Áreas 18-19, GLD, GLV, P	G.M., T.O.
Anterioridad A+6		C: 18-19, GLD, GLV, P. y PR.	R.O.,T.O,GM
Anterioridad A+5		Corteza: Áreas 18-19, G.L. y P.	G.M.
Anterioridad A+4	C.S.,E.G.M.,E.G.P., E.G.S.	Corteza: Áreas 18 y 19, G.L.	G.M.
Anterioridad A+3	C.S.,E.G.M.,E.G.P., E.G.S.	Corteza: Áreas 18 y 19	
Anterioridad A+2	C.S.,E.G.M.,E.G.P., E.G.S.	Corteza: Áreas 17, 18 y 19	
Anterioridad A+1	C.S.,E.G.M.,E.G.P., E.G.S.	Corteza: Áreas 17, 18 y 19	
Anterioridad A+0	C.S.	Corteza: Áreas 17, y 18	
Anterioridad A-1		Corteza: Áreas 17, y 18	
Anterioridad A-2		Corteza: Áreas 17, y 18	
Anterioridad A-3		Corteza: Áreas 17, y 18	
Anterioridad A-4		Corteza: Áreas 17, y 18	
Anterioridad A-5		Corteza: Áreas 17, y 18	
Anterioridad A-6		Corteza: Áreas 17, y 18	
Anterioridad A-7		Corteza: Áreas 17, y 18	
Anterioridad A-8		Corteza: Áreas 17, y 18	
Anterioridad A-9		Corteza: Áreas 17, y 18	
Anterioridad A-10		Corteza: Áreas 17, y 18	

Colículo Superior: C.S.; Corteza: Corteza; Stratum Griseum Medium: E.G.M.; Stratum Griseum Profundum: E.G.P.; Stratum Griseum Superficial: E.G.S.; Geniculado Lateral: G.L.; Geniculado Lateral Pars Dorsalis: GLD; Geniculado Lateral Pars Ventralis: GLV; Preteectum: PR; Pulvinar: P; Quiasma Óptico: Q.O.; Tracto Óptico: T.O.

Tabla II. Localización de receptores de met-enkefalina en la vía óptica del gato

Inmunorreactividad	Cuerpo Geniculado Lateral (G) Pulvinar (PL)
Baja	Pretectum (PTE) Corteza Visual (Áreas 17,18 y 19)
Inmunorreactividad	Colículo Superior (CL) Stratum Griseum MEDIUM (SGM)
Moderada	Stratum Griseum Profundum Stratum Griseum Superficial

sidades de fibras y terminales encefalinérgicas en el SNC (10,11).

Otros lugares donde se objetivó la existencia de met-enkefalina fueron: los somas del cuerpo estriado, núcleo hipotalámico supraóptico y paraventricular y núcleos del tronco cerebral; fibras del telencéfalo en ciertas regiones de la corteza, septum lateral, núcleo central de la amígdala y cuerpo estriado; en diencefalo tálamo, hipotálamo y subtálamo; del mesencéfalo formación reticular, sustancia gris periacueductual (SGPA) y núcleo interpeduncular; del tronco del encéfalo formación reticular, núcleo del rafe, locus coeruleus, núcleo del tracto solitario, núcleo espinal del trigémino, núcleo coclear, núcleo parabraquial, núcleo comisural y núcleo de pares craneales. También se objetivó presencia de met-enkefalina en el tálamo del gato (10).

Respecto al fenómeno de coexistencia (1) en la vía óptica antes apuntada donde se objetivó la existencia de met-enkefalina y teniendo en cuenta la coexistencia peptídica y no peptídica (1,4), se evidenció su coexistencia con otro neurotransmisor clásico o no peptídico.

La met-enkefalina o Sustancia P, es una molécula que actúa como neurotransmisor ya que cumple los requisitos exigidos para estos; es asimismo un neuro-modulador y también actúa como hormona teniendo actividad neuroendocrina ya que actúan sobre la hipófisis. La met-enkefalina está implicada en diferentes comportamientos y fenómenos fisiológicos que comprenden desde la percepción y modulación del dolor a la respuesta al stress y el aprendizaje.

Algunos autores han encontrado met-enkefalina en algunas estructuras de la vía óptica: En la retina de la tortuga (18) y en la de la salamandra (19); en el pretectum de la paloma (20); en el núcleo geniculado (21,22) y colículo superior de la rata (20,21); en el conejo (23) y en el gato más recientemente (24).

Parece que la Sustancia P, a través de las células amacrinas, interviene en el desarrollo y funcionamiento de la retina del conejo (28). Mediante técnicas de inmunorreactividad se ha demostrado la presencia de Sustancia P en la retina humana, concretamente en la capa de fibras nerviosas, pero no en la capa plexiforme interna. A través de las células amacrinas se le ha supuesto cierta relación en la formación del retinoblastoma humano (28,30).

Tras objetivar la existencia de met-enkefalina en determinadas estructuras de la vía óptica, se demostró su posible interrelación con otras estructuras de la vía óptica (27,28), suponiéndose un papel en el tracto retino-hipotalámico relacionado con el ciclo de la luz y la oscuridad (29) y cierta actividad en el desarrollo y funcionalidad de la retina (25). En dicha situación, nos planteamos el papel que desempeñaría en su fisiología. Partiendo de la base de que dicho pentapéptido es un neurotransmisor inhibitorio, podría inhibir la neurotransmisión de dicha vía desempeñando un papel en la regulación del impulso nervioso en estas estructuras. La activación de las fibras del sistema óptico producida por agentes estimulantes físicos externos (estimulantes lumínicos) y/o químicos-endógenos se vería antagonizada o parcialmente inhibida.

Podría pensarse que la base bioquímica-funcional de una «visión agradable» pudiera estar relacionada con la liberación de met-enkefalina liberada tras la percepción, la cual a través de una conexión directa con el sistema límbico produciría el fenómeno gratificante. Otro posible mecanismo sería que tras liberar met-enkefalina en el líquido cefalorraquídeo y en sangre se estimulara indirectamente dicho sistema límbico. O en forma conjunta ambos mecanismos.

Otro aspecto a destacar es relativo a la existencia de miosis y midriasis tras la administración de opiáceos endógenos y a su abstinencia, respectivamente. Haber encontrado inmunorreactividad a las met-enkefalina en el Pretectum pudiera explicar, al menos en parte, este fenómeno ya que la vía desde la retina hasta el Pretectum es importante en el reflejo pupilar.

Puede entenderse una buena relación anatómico-fisiológica al objetivar inmunorreactividad frente a la met-enkefalina tanto en el núcleo Pulvinar como en Áreas 18 y 19 de la Corteza Visual (áreas extraestriadas), es bien conocido que este complejo núcleo talámico se proyecta ampliamente hacia regiones corticales visuales extraestriadas y que muchas de estas regiones corticales se proyectan de forma recíproca hacia el Pulvinar (28).

De los conocimientos acumulados sobre la presencia de metencefalina en la vía óptica se puede deducir que:

– La presencia del neurotransmisor inhibidor met-encefalina en la vía óptica del gato actuaría inhibiendo o enlenteciendo la neurotransmisión en dicha vía.

– La no inmunorreactividad a met-encefalina en algunos segmentos de la vía óptica no excluye que pudiera estar presente en dicha vía.

– La presencia de inmunorreactividad a met-encefalina en la vía óptica del gato fundamenta neuro-histoquímicamente la funcionalidad de dicha vía.

– La existencia de met-encefalina en la vía óptica del gato podría contribuir a la utilización racional y científica de fármacos agonistas o antagonistas de dicho péptido en la patología de la vía óptica.

Se confirma la existencia de inmunorreactividad a met-encefalina en la vía óptica del gato, lo que implica a este pentapéptido en la funcionalidad de dicha vía.

La distribución del pentapéptido met-encefalina en la vía óptica del gato se objetiva en todo el encéfalo: porción cortical y subcortical.

La presencia de met-encefalina en la vía óptica del gato contribuye a la mejor comprensión funcional y bioquímica de dicha vía.

BIBLIOGRAFÍA

- Hokfelt T, Lundberg JM, Schultzberg GM, Johansson O, Ljungdahl A, Rehfeld, J. Coexistence of peptides and putative transmitters in neurons. *Adv Biochem Psychopharmacol* 1980; 22: 1-23.
- Johansson O, Hokfelt T, Pernow B, Jeffcoate SL, White N, Steinbusch, HW, et al. Immunohistochemical support for three putative transmitters in one neuron: coexistence of 5-hydroxytryptamine, substance P and thyrotropin releasing hormone-like immunoreactivity in medullary neurons projecting to the spinal cord. *Neuroscience* 1980; 6: 1857-1881.
- Leah JD, Cameron AA, Kelly WL, Snow PJ. Coexistence of peptide immunoreactivity in sensory neurons of the cat. *Neuroscience* 1985; 16: 683-690.
- Jansens KL, Faull RL, Dragunow M. Distribution of excitatory aminoacid, sigma, monoamina, catecholamine, acetilcolina, opioid, Substance P, adenosina and neuro-peptide receptor in human motor and somatosensory cortex. *Brain Res* 1991 566: 225-238.
- Goldstein A. Opioid peptides endorphins in pituitary and brain. *Science* 1976; 193: 1081-1086.
- Paterson SJ, Robson LE, Kosterlitz HW. Classification of opioid receptors. *Brain Med Bull* 1983; 39: 31-36.
- Hughes J. Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res* 1975; 88: 295-308.
- Leboyer M. Endomorphines. Physiological and pharmacological aspects and research in psychiatry. *Encephale* 1986; 12: 45-62.
- Rossier J. Enkephalin biosynthesis: the search for a common precursor. *Trends. Neuroscience* 1981; 4: 94-97.
- Miguel-Hidalgo JJ, Senba E, Takatsuji K, Tohyama M. Fine structure of synapses and retinal innervation of substance P and adenosin deaminase containing neurons in the superior colliculus of the rat. *J Comp Neurol* 1991; 303: 63-74.
- Reinoso-Suarez F. *Topographischer Hirn Atlas der Katze*. Ed. Merck A.G. Darmstadt, 1961.
- Pickel VM, Sumal KK, Beckley SC, Miller RJ, Reis, DJ. Immunocytochemical localization of enkephalin in the neostriatum of rat brain: a light and electron microscopic study. *J Comp Neurol* 1980; 189: 721-740.
- Somogyi P, Priestley JV, Cuellar AC, Smith AD, Takagi, H. Synaptic connections of enkephalin-immunoreactive nerve terminals in the neostriatum: a correlated light and electron microscopic study. *J Neurocytol* 1982; 11: 779-807.
- Vazquez J, Muñoz M, Coveñas R. Alterations on the distribution of methionine-enkephalin-like in the cat thalamus after electroacupuncture: an immunocytochemical study. *J Hirnforsch* 1990; 31: 555-561.
- Akil H, Watson SJ, Young E, Lewis ME, Khachaturian H, Walker JM. Endogenous opioids: biology and function. *Annu Rev Neurosci* 1984; 7: 223-255.
- Weiler R. Mesencephalic pathway to the retina exhibits enkephalin-like immunoreactivity. *Neurosci Lett* 1985; 55: 11-16.
- Glaser G, Himstedt W, Weiler R, Matute C. Putative neurotransmitters in the retinae of three urodele species (*Triturus alpestris*, *Salamandra salamandra*, *Pleurodeles waltli*). *Cell Tissue Res* 1988; 252: 317-328.
- Reiner A, Karter HJ, Brecha NC. Enkephalin-mediated basal ganglia influences over the optic tectum: immunohistochemistry of the tectum and the lateral spiriform nucleus in pigeon. *J Comp Neurol* 1982; 208: 37-53.
- Abe J, Okamura H, Makino S, Yanaihara N, Iyata Y. Immunocytochemical distribution of [Met]enkephalin-Arg-Gly-Leu immunoreactivity in the rat diencephalon. *Brain Res Bull* 1987; 19: 735-741.
- Card JP, Moore RY. Organization lateral geniculate-hypothalamic connections in the rat. *J Comp Neurol* 1989; 284: 135-147.
- Miguel-Hidalgo JJ, Senba E, Takatsuji K, Tohyama M. Substance P and enkephalins in the superficial layers of the rat superior colliculus: differential plastic effects of retinal deafferentation. *J Comp Neurol* 1990; 299: 389-404.
- Okamoto S, Okamura H, Akagi Y, Yanaihara N, Iyata Y. Possible induction of [Met]-enkephalin-Arg6-Gly7-Leu8 immunoreactivity in neurons of the rat superior colliculus following eye enucleation. *Neurosci Lett* 1990; 120: 74-79.
- Vecino E, Ekstrom P. Distribution of Met-enkephalin, Leu-enkephalin, substance P, neuropeptide Y, FMRFamide, and serotonin immunoreactivities in the optic tectum of the Atlantic salmon (*Salmo salar* L). *J Comp Neurol* 1990; 299: 229-241.

24. Illing RB, Nikolarakis KE, Wichmann T, Spatz WB, Starke K. Release of met-enkephalin and its modulation through acetylcholine receptors in the rabbit superior colliculus. *Exp Brain Res* 1990; 82: 663.
25. Vazquez J, Muñoz M, Garcia JC. Modifications in the distribution of met-enkephalin in the pons of the cat, following the intravenous administration of clonidine: an immunocytochemical experimental study. *Histol Histopathol* 1998; 13: 619-626.
26. Casini G, Dal Monte M, Fornai F, Bosco L, Willems D, Yang Q, et al. Neurokinin 1 receptor expression and substance P physiological actions are developmentally regulated in the rabbit retina. *Neuroscience* 2004; 124: 147-160.
27. Tarkkanen A, Tervo T, Eranko L, Cuello AC. Substance P immunoreactivity in normal human retina and in retinoblastoma. *Ophthalmic Res* 1983; 15: 300-306.
28. Miguel-Hidalgo JJ, Senba E, Takatsuji K, Tohyama M. Effects of the eye-enucleation on substance P-immunoreactive fibers of some retinorecipient nuclei of the rat in relation to their origin from the superior colliculus. *Neuroscience* 1991; 44: 235-243.
29. Oyadama H, Takatsuji K, Senba E. Postnatal development NK1, NK2 and NK3 neurokin receptors expression in the rat retina. *Brain Res.Dev Brain Res.* 1999, 117: 59-70.
30. Muñoz M, Rosso M, Montero-Espinosa I. Neurokinin-1 receptors located in human retinoblastoma cell lines: anti-tumor action of its antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007; 48: 2775-2781.