



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA

**SEGREGACIÓN DE NEUROTRANSMISORES EN
NEURONAS SIMPÁTICAS DE GCS DE RATAS WISTAR
SOMETIDAS A ESTRÉS POR EXPOSICIÓN AL FRÍO.**

TESIS

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA**

P R E S E N T A:

JESSICA ABIGAIL FERIA PLIEGO

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central

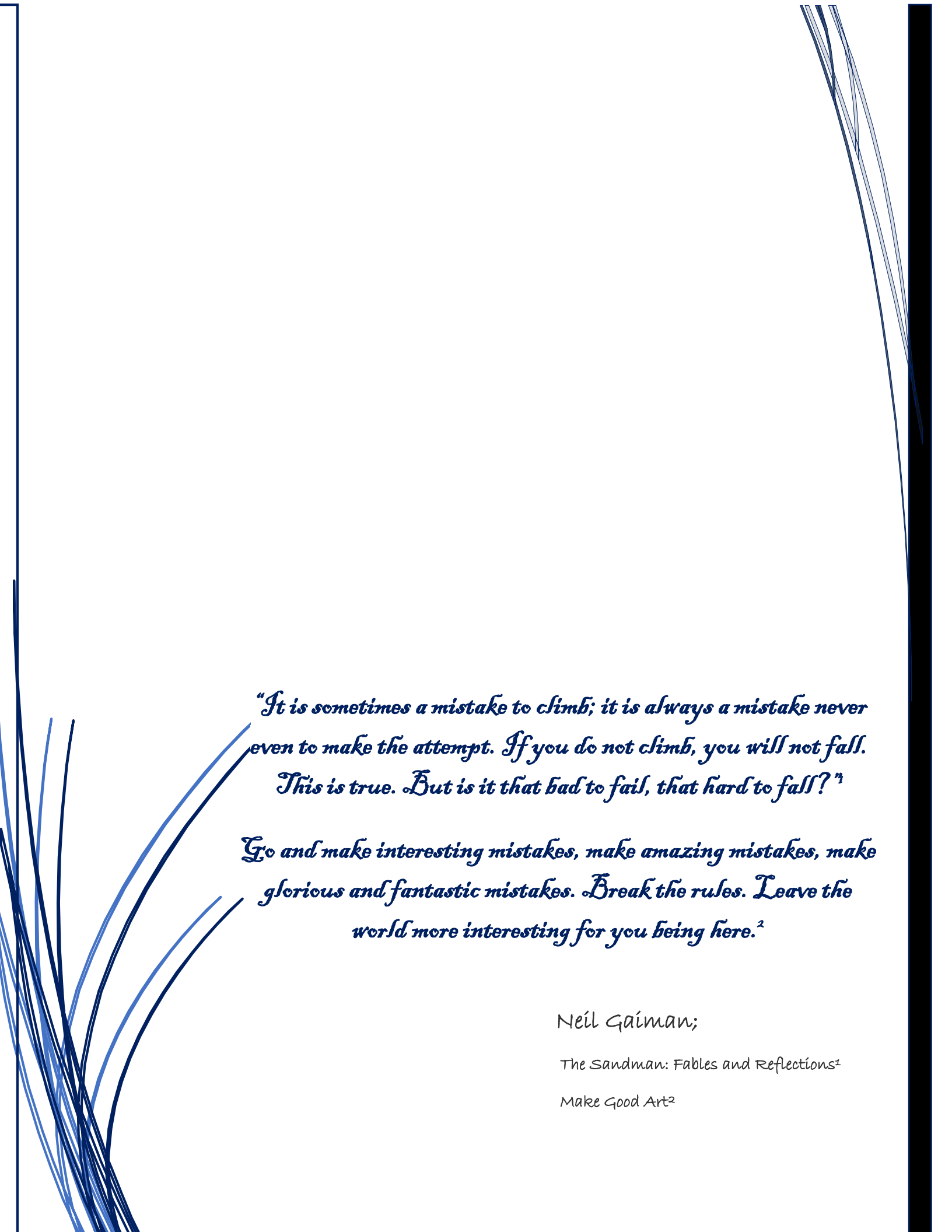


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



"It is sometimes a mistake to climb; it is always a mistake never even to make the attempt. If you do not climb, you will not fall. This is true. But is it that bad to fail, that hard to fall?"¹

Go and make interesting mistakes, make amazing mistakes, make glorious and fantastic mistakes. Break the rules. Leave the world more interesting for you being here.²

Neil Gaiman;

The Sandman: Fables and Reflections¹

Make Good Art²

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Miguel Morales por brindarme la oportunidad y el apoyo de aprender y crecer profesionalmente bajo su tutela. Gracias por brindarme la confianza para llevar a cabo este proyecto.

Al Dr. Fredy Cifuentes, gracias por compartir conmigo su tiempo y conocimientos.

A María Elena Zetina gracias por su valiosa ayuda a lo largo de este proyecto, no sólo por brindarme parte de las bases prácticas y teóricas para llevar a cabo el proyecto sino también por su disponibilidad a ayudarme cada vez que cometí un error.

A Pedro Medina por su valiosa ayuda en la manipulación de animales de laboratorio, gracias por compartir conmigo sus conocimientos y por su paciencia al enseñarme los secretos de las cirugías.

A Ángeles Cancino Rodezno, gracias por hacer un pequeño espacio en tu agenda para instruirme en el arte del Western Blot, gracias por tu paciencia y tus divertidas clases.

A todos mis compañeros de laboratorio, Luis, Carlos, Rommel, Filiberto, Diana y Manuel, muchas gracias por toda su ayuda y por crear un ambiente de convivencia ameno en el laboratorio. A Filiberto y Diana, gracias por iniciarme en la captura y análisis de imágenes y por estar dispuestos a discutir la parte teórica del proyecto cada que fue necesario. A Manuel, muchas gracias por compartir conmigo todo tu conocimiento sobre el modelo de estrés, el Western Blot y PCR, sin tu guía este proyecto hubiese sido más difícil de terminar.

A mis sinodales: al Dr. Buijs, la Dra. Limei, la Dra. Massieu y al Dr. Aguilar. Sobre todo, gracias al Dr. Raúl Aguilar por ser una guía dentro y fuera del laboratorio y, principalmente por inspirarme a dedicarme al campo de las neurociencias.

De igual manera quisiera agradecer a todas aquellas personas que, si bien no contribuyeron de forma directa al proyecto, su ausencia habría hecho casi imposible llegar a este día.

A la Dra. Chagoya y a todo el equipo del IFC-305 Sur (Mariana, Rebe, Nuria, Jesús, Lupita, Gaby, Marisol, Enrique, a todos ;) por su apoyo y sus palabras de aliento, sobretodo, gracias por demostrarme lo que significa ser una "familia académica".

A la generación 2012-2015 de la LIBB, porque con ustedes comencé este camino y a lo largo de estos 5 años he tenido la oportunidad de aprender algo de cada uno. Especial gracias a Gianfranco, por todo tu apoyo y por confiar en que siempre podía salir adelante.

A todos y cada uno de los miembros de la familia HVHM (Palolis, Beto, Ana, Pixel, Mar, Jess, Gee, Alesha, Zay y Marco), gracias por compartir conmigo todos estos años, por todos los momentos divertidos que hemos vivido, por ayudarme a crecer como persona y enseñarme a reír de mi misma.

A Esme, porque, a pesar de ser mi hermana, te has convertido en una verdadera aliada y amiga.

A Ale, por enseñarme el valor de la confianza en uno mismo y en los demás, y sobre todo por demostrarme que sin importar que tan fuerte te golpee la vida, siempre es posible salir adelante.

A mi papá, gracias por tu cariño, interés y apoyo a lo largo de toda mi vida.

A mi mamá, por ser un verdadero ejemplo a seguir, por todos los sacrificios que has hecho por mí, y por no temer hablarme con la verdad cuando es necesario.

Muchas gracias

ABREVIATURAS

5TH – 5 Hidroxitriptamina o serotonina

ACh - Acetilcolina

BCA – Ácido Bicinconínico

CGRP – Péptido del gen relacionado con la calcitonina

GABA – Ácido γ amino butírico

GAD65/67 – Descarboxilasa de ácido glutámico

GCS – Ganglio cervical superior

MA – Médula Adrenal

ELH – Egg laying hormone

ENK – Enkefalina

NA – Noradrenalina

NIL—Núcleo intermedio lateral

NT - Neurotensina

Nts - Neurotransmisores

NPS – Neuronas preganglionares simpáticas

PBS – Buffer de fosfatos

RT-PCR - Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

SNC – Sistema Nervioso Central

SNP – Sistema Nervioso Periférico

SNS – Sistema Nervioso Simpático

SOM - Somatostatina

TH – Hidroxilasa de Tirosina

VACHT – Transportador Vesicular de Acetilcolina

VIP – Péptido Intestinal Vasoactivo

VTA – Área ventral tegmental

RESUMEN

La sinapsis es la unión funcional de dos neuronas que permite el intercambio de información entre ellas. Existen dos tipos de sinapsis: la eléctrica y la química. Durante la comunicación eléctrica un flujo de iones pasa de una neurona a otra a través de canales especializados en la membrana celular. En la comunicación química la neurona pre-sináptica libera mensajeros químicos, denominados neurotransmisores, que modifican la actividad de la neurona post-sináptica.

En 1957, Eccles enuncia el “Principio de Dale”, el cual establece la idea de que una neurona libera únicamente un neurotransmisor. Años después, Owman (1964), Jaim-Etcheverry y Zieher (1969) reportan la capacidad de las neuronas de poseer más de un neurotransmisor (coexistencia), y Burnstock (1976) publica la hipótesis de la cotransmisión, señalando la capacidad de las neuronas de sintetizar, almacenar y liberar más de un neurotransmisor. Estos hallazgos llevaron a la reformulación del Principio de Dale, estipulando que una neurona libera el mismo juego de transmisores desde todos sus botones sinápticos. Desde entonces, se ha aceptado de forma general la coexistencia del mismo grupo neurotransmisores en los botones de una neurona, sin considerar la posibilidad de que estos puedan segregarse.

En 1990, Sossin y colaboradores desafían el principio de Dale y publican la primera evidencia de segregación, al hallar en neuronas de *Aplysia californica* que el precursor de ELH (Egg-laying hormone) es proteolizado en péptidos que son distribuidos en distintas vesículas, las cuáles son segregadas espacialmente en diferentes procesos. A partir de esta publicación, surgen varios estudios que reportan segregación de neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico de mamíferos.

Las neuronas preganglionares simpáticas (NPS), ubicadas en el núcleo intermediolateral de la médula espinal, co-expresan principalmente acetilcolina (ACh) y diferentes neuropéptidos, como mENK (metionina encefalina). Asimismo, se ha reportado la existencia de una subpoblación de neuronas simpáticas preganglionares que co-expresan VAChT (transportador vesicular de ACh) y GAD65/67 (descarboxilasa de ácido glutámico) (Ito *et al*, 2005,2007). Lindh *et al* (1986) y Morales *et al* (1995) hallaron en nervios de NPS la presencia de botones positivos a mENK pero negativos a ACh, siendo las primeras evidencias de segregación de neurotransmisores en estas neuronas.

En el laboratorio del Dr. Morales se ha estudiado la segregación en neuronas simpáticas (Sámano *et al*, 2012), y se ha encontrado que las NPS del ganglio cervical superior (GCS) de rata co-expresan ACh con diversos neuropéptidos en

sus somas, pero en sus procesos axonales los péptidos se segregan de ACh (Sámano, 2009).

Además, se halló que la segregación de neurotransmisores es un fenómeno plástico, al ser susceptible a cambios del entorno sináptico (Vega *et al*, 2013). En otros estudios en el laboratorio se ha encontrado que las NPS tienen la capacidad de segregar ACh y GABA (dos neurotransmisores clásicos) en distintas varicosidades y que esta segregación no es homogénea, si no que sigue un gradiente caudo-rostral (Elinos *et al*, 2016).

Con el objetivo de confirmar la plasticidad de la segregación de neurotransmisores y develar la relevancia fisiológica que en el GCS pueda tener, en este proyecto, se plantea analizar, a través de técnicas de inmunofluorescencia, los cambios en la segregación de neurotransmisores en ratas sometidas a estrés (un estado de hiperactividad simpática).

Para validar la eficacia del modelo de inducción de estrés por exposición al frío, se analizaron, a través de RT-PCR y western blot, los niveles de expresión de tirosina hidroxilasa (TH) en médula adrenal (MA). Nuestros resultados de aumento en los niveles de TH (mRNA y proteína) en MA, así como una disminución en la masa corporal de ratas confirman la eficacia de este modelo en la inducción de estrés.

Los datos obtenidos hasta el momento señalan un aumento notable tanto en la segregación de GABA-ACh (GABA marcado a través de GAD67 y ACh a través de VAcHT), así como en la de mENK y ACh; y mayor expresión de mENK en GCS de ratas sometidas a estrés. Estos resultados sugieren que los cambios en la función del sistema simpático que subyacen al estrés podrían estar correlacionados con cambios en la expresión y segregación de neurotransmisores en el GCS de la rata. El aumento en la segregación de GABA y mENK, así como el aumento en la presencia de mENK, así como el aumento en la segregación de GABA, podrían señalar un mecanismo que intenta contrarrestar el estado de hiper-actividad neuronal que se origina como consecuencia del estrés.

CONTENIDO

Introducción	1
Sinapsis química	2
Cotransmisión	2
Segregación de neurotransmisores	4
Segregación de neurotransmisores en GCS	5
Estrés	6
Planteamiento del problema	8
Hipótesis.....	8
Objetivo.....	8
Diseño Experimental	9
Sujeto experimental	9
Inducción de estrés.....	10
RT-PCR	10
Western blot	11
Inmunofluorescencia	12
Evaluación de la expresión e inmunoreactividad	14
Resultados.....	15
Pérdida de masa corporal en ratas sometidas a estrés	15
La expresión de TH aumenta en MA de ratas sometidas a estrés	15
Co-expresión de ACh-GABA y ACh-ENK en neuronas preganglionares simpáticas.....	17
Cambios en la expresión de neurotransmisores en GCS de ratas sometidas a estrés	18
Cambios en la segregación de neurotransmisores en GCS de ratas sometidas a estrés	20

Discusión.....	23
Conclusiones.....	25
Anexos.....	26
Sistema Nervioso Periférico.....	26
Estrés.....	28
Sistema Nervioso Simpático y estrés.....	29
Referencias	32

INTRODUCCIÓN

La función principal de las neuronas es recibir, modificar y transmitir mensajes. Esto es logrado a través de uniones funcionales denominadas sinapsis; existen dos tipos: la eléctrica y la química (**Figura 1**).

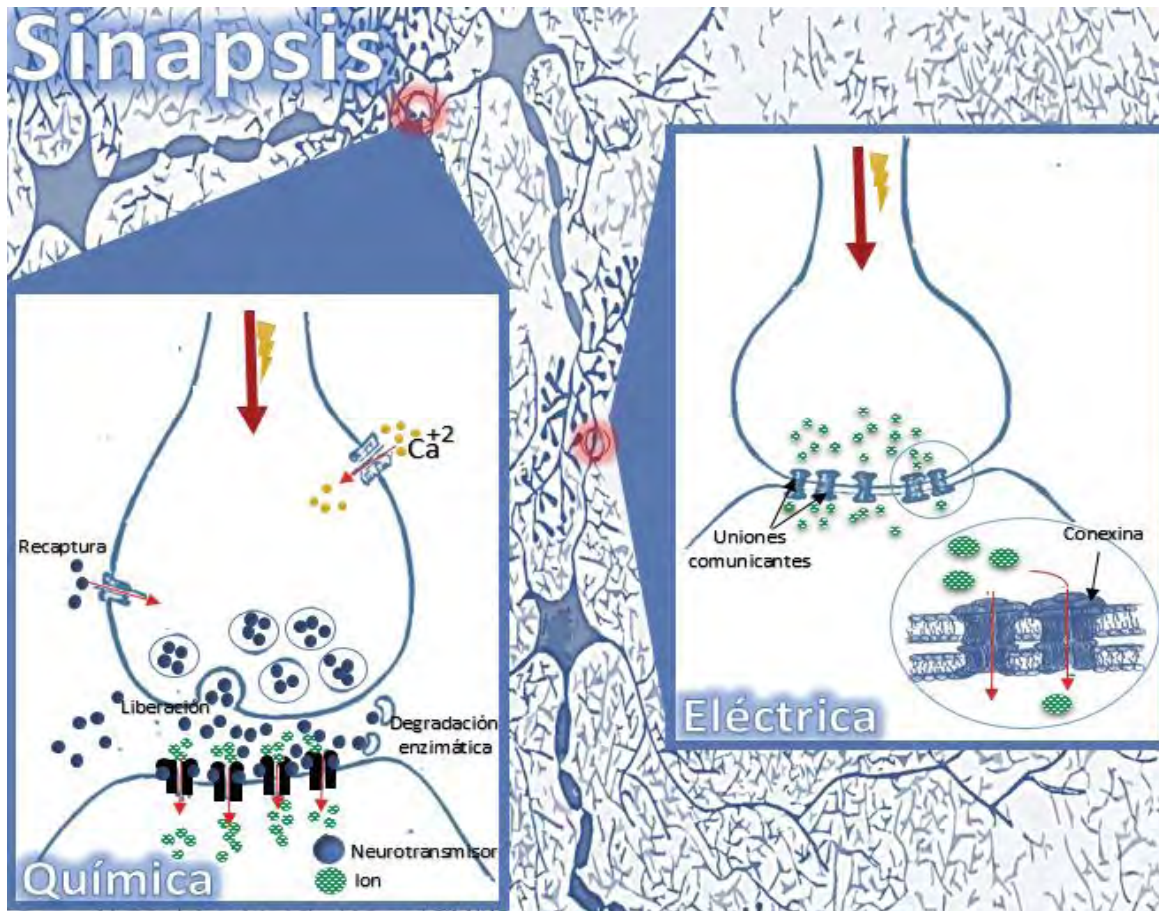


Figura 1. Sinapsis química y eléctrica. Esquema representativo de algunos de los eventos que toman lugar durante la transmisión química y la eléctrica.

En la comunicación eléctrica un flujo de corriente pasa de una neurona a otra a través de canales especializados en la membrana celular (uniones comunicantes). Mientras que en la comunicación química la neurona pre-sináptica libera mensajeros químicos, denominados neurotransmisores, que modifican la actividad de la neurona post-sináptica (Levitán & Kaczmarek, 2008b).

Sinapsis química

Casi 35 años después de que se estableció el concepto de sinapsis (Sherrington, 1897 & 1906), se demostró que, en las neuronas del Sistema Nervioso Periférico (SNP), la transmisión de información a través de la sinapsis podía ser mediada por una sustancia química (neurotransmisor) liberada desde una neurona para alterar la excitabilidad de otra neurona o músculo (Loewi, 1921, Valenstein, 2002; Levitán & Kaczmarek, 2008). En la década de los 50's, este principio fue aceptado como cierto para el sistema nervioso central (SNC) gracias a la identificación de la serotonina y acetilcolina como neurotransmisores en cerebro (Twarog & Page, 1954; Eccles *et al*, 1956).

Los neurotransmisores (Nts) son moléculas sintetizadas en la neurona presináptica, almacenadas en vesículas en las terminales presinápticas, y liberadas por la acción de una estimulación nerviosa. Tras su liberación, los Nts actúan sobre receptores postsinápticos específicos, modifican el potencial de membrana de la neurona postsináptica, y finalmente son removidos o degradados después de su acción (**Figura 1**).

Cada neurotransmisor tiene la capacidad de ser excitador o inhibitor, dependiendo del tejido donde actúe (Sámano *et al*, 2012).

Cotransmisión

En 1935 Sir Henry Dale enuncia que “una neurona es una unidad metabólica que opera en todas sus sinapsis bajo el mismo mecanismo de transmisión química”. Con base en estas palabras, en 1957, Eccles proclama el “Principio de Dale”, el cual establece la idea de que una neurona libera únicamente un neurotransmisor (Eccles, 1957).

Años después, Owman (1964) y Jaim-Etcheverry & Zieher (1969) reportan la capacidad de los nervios adrenérgicos de la glándula pineal de almacenar

noradrenalina (NA) y 5 hidroxitriptamina (5HT) como resultado de la administración exógena de 5HT y utilizan por vez primera el término coexistencia. Posteriormente, Furshpan (1976), Landis (1976) Patterson y Chun (1974) publican evidencia directa de la presencia de más de un transmisor en una neurona, al encontrar la expresión de acetilcolina (ACh) y NA en neuronas simpáticas co-cultivadas con miocitos.

En la década de los 70's Burnstock encuentra que algunas neuronas adrenérgicas del SNP podían almacenar y liberar tanto NA como ATP y neuropéptido Y (NPY); y en 1976 publica la hipótesis de la cotransmisión, señalando la capacidad de las neuronas de sintetizar, almacenar y liberar más de un neurotransmisor (Burnstock, 2004). Estos hallazgos condujeron a la reformulación del Principio de Dale, estipulando que una neurona libera el mismo juego de transmisores desde todos sus botones sinápticos (**Figura 2B**).

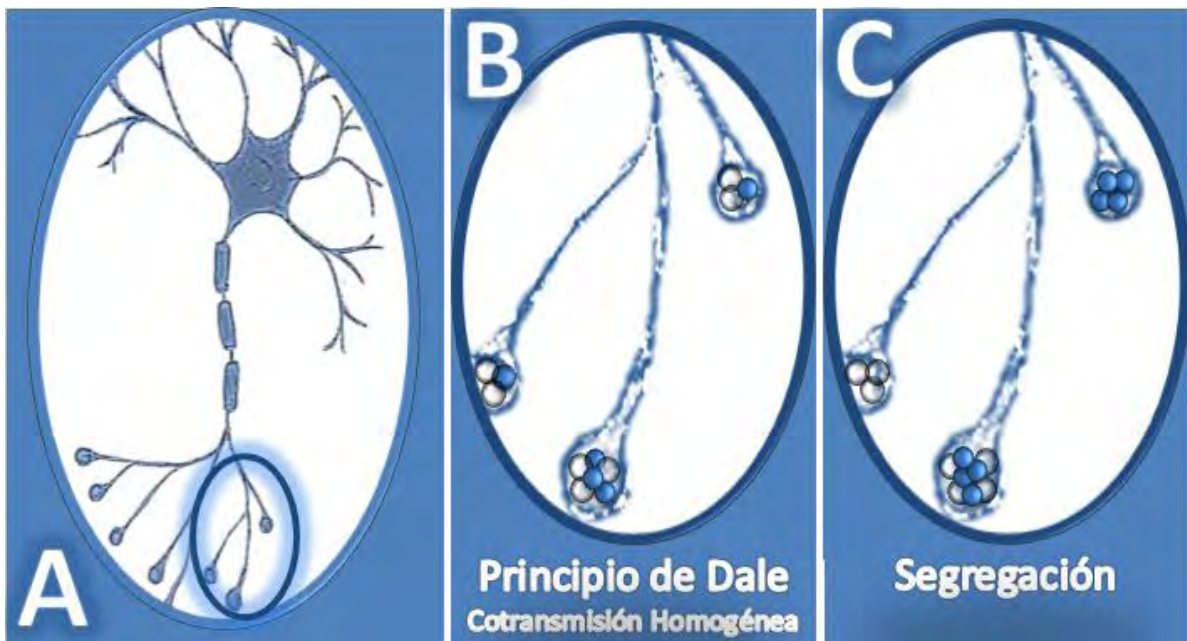


Figura 2. Principio de Dale vs. Segregación de neurotransmisores. Esquema representativo de la morfología típica de una neurona (**A**). El Principio de Dale, establece que las neuronas almacenan y liberan el mismo conjunto de neurotransmisores desde cada uno de sus botones sinápticos (**B**). Por otro lado, en **C**, se plantea la opción de que las neuronas distribuyan sus Nts de forma diferencial en sus distintos botones sinápticos, hipótesis conocida como Segregación.

Desde entonces, se ha aceptado de forma general la coexistencia del mismo grupo transmisores en los botones de una neurona, sin considerar la posibilidad de segregación (**Figura 2C**).

La aceptación de la hipótesis de la cotransmisión condujo a una nueva clasificación de los neurotransmisores. De acuerdo a su efecto en la célula blanco, los Nts se clasifican dentro de dos grandes familias: transmisores clásicos y cotransmisores. Los transmisores clásicos son moléculas capaces de transmitir una señal principal (producir una respuesta eléctrica en la célula blanco); mientras que los cotransmisores, son mensajeros que sin inducir necesariamente una respuesta eléctrica son capaces de potenciar o disminuir el efecto de los neurotransmisores clásicos (Burnstock 1976).

Segregación de neurotransmisores

En 1990, Sossin y colaboradores desafían el principio de Dale y publican la primera evidencia de segregación, en ese trabajo encuentran que en neuronas de *Aplysia californica* el precursor de ELH (Egg-laying hormone) es proteolizado en péptidos que son distribuidos en distintas vesículas, las cuáles son segregadas espacialmente en diferentes procesos. A partir de esta publicación, surgen varios estudios que reportan segregación de neurotransmisores en el sistema nervioso central y periférico de mamíferos.

En 1999, Blitz y Nusbaum encuentran en el cangrejo *Cancer borealis* que las neuronas del sistema nervioso estomatogástrico son capaces de liberar GABA y proctolina a diferentes blancos. Marder (1999) se basa en el trabajo de Blitz y propone 3 posibilidades de almacenamiento y liberación de múltiples transmisores, entre ellas la segregación.

En 2000 Rayport y colaboradores hallan que tanto *in vitro* como *in vivo* las neuronas dopaminérgicas del área ventral tegmental (VTA) segregan dopamina y glutamato, mostrando por primera vez evidencia de segregación de dos transmisores clásicos

en el SNC (Rayport, 2001). En 2005, el grupo de Nishimaru publicó evidencia de segregación de Nts clásicos en SNP al encontrar segregación de ACh y glutamato en motoneuronas espinales (Nishimaru *et al*, 2005).

Segregación de Nts en el ganglio cervical superior (GCS)

Las neuronas preganglionares simpáticas (NPS), ubicadas en el núcleo intermediolateral de la médula espinal co-expresan ACh y diferentes neuropéptidos (metionina encefálica (mENK), péptido intestinal vasoactivo (VIP), péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP)) (**Figura 3C-3H**), q

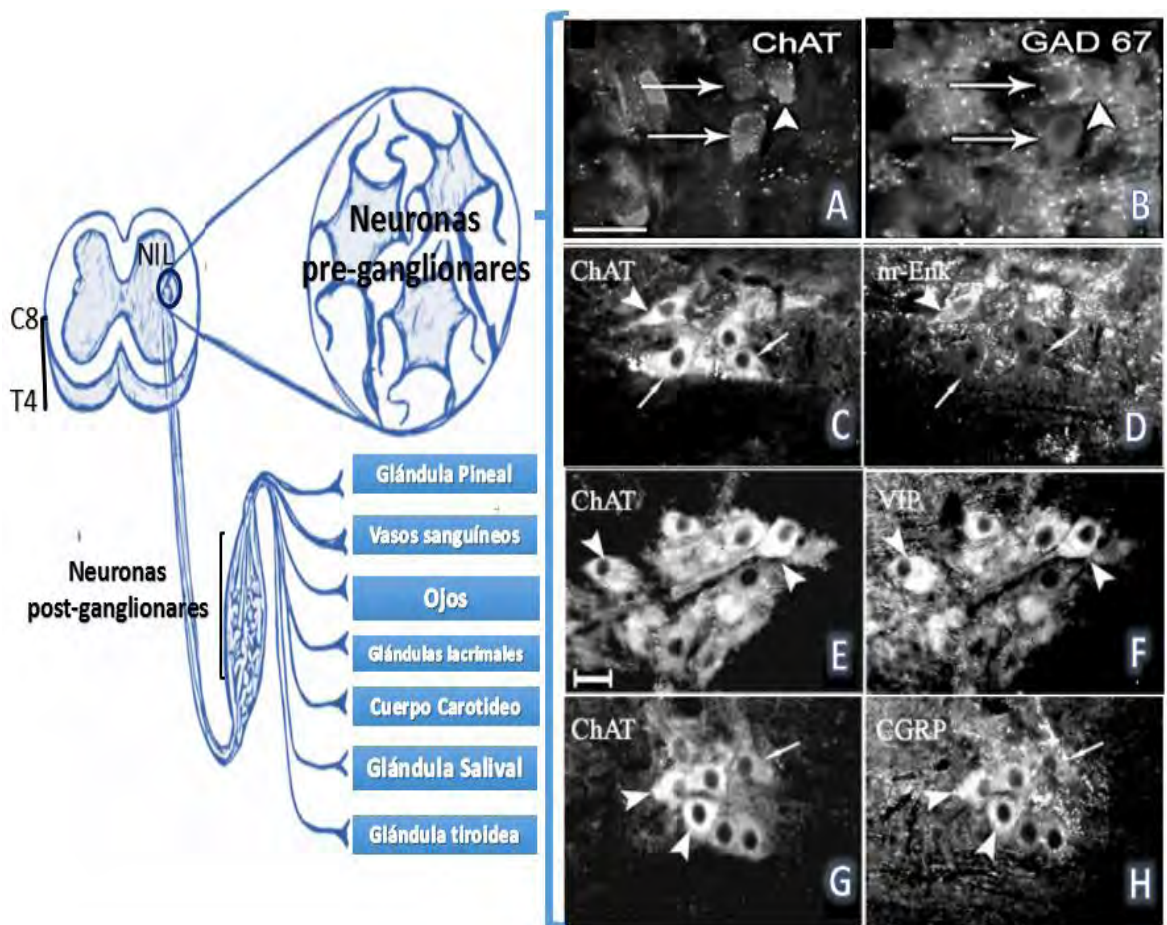


Figura 3. Estructura e inervaciones del GCS. El primer panel del esquema la ubicación de las neuronas preganglionares simpáticas y los órganos inervados por las postganglionares. El segundo panel presenta evidencia de la expresión de ACh y otros Nts en neuronas preganglionares: fotomicrografías de inmunofluorescencia con marcadores para ChAT (**A, C, E, G**), GAD67 (**B**), m ENK (**D**), VIP (**F**) y CGRP (**H**) (**3A y 3B**: Elinos *et al*, 2016; **3C-3H**: Sámano *et al*, 2006)

Asimismo, se ha reportado la existencia de una subpoblación de neuronas preganglionares simpáticas que co-expresan VACHT y GAD65/67 (Ito *et al*, 2005, 2007; Elinos *et al*, 2016; **Fig. 3**). Lindh *et al* (1986) y Morales *et al* (1995) hallaron en terminales nerviosas de NPS la presencia de botones positivos a mENK, pero negativos a ACh, siendo las primeras evidencias de segregación de neurotransmisores en estas neuronas.

En el laboratorio del Dr. Morales se ha estudiado la segregación en neuronas simpáticas, y se ha encontrado que las NPS del GCS co-expresan ACh con diversos neuropéptidos en sus somas (neurotensina, mENK, somatostatina, CGRP y VIP), pero en sus procesos axonales los péptidos se segregan de ACh (Sámano *et al*, 2006).

Recientemente, Elinos y colaboradores (2016) encontraron que las NPS del GCS que coexpresan tanto ACh como GABA tienen la capacidad de segregar estos dos transmisores clásicos a distintas varicosidades.

La segregación de Nts en GCS es un fenómeno plástico y responde a requerimientos sinápticos y a factores ambientales. Esto fue demostrado por Vega quién encontró que las NPS modifican la segregación de ENK- ACh en presencia o ausencia de neurotrofinas, tanto en condiciones *in vitro* (2010) como *in vivo* (2015).

Debido a que la segregación de neurotransmisores puede de sufrir cambios en función de alteraciones en el entorno sináptico, es de suponer que, en condiciones de disfunción simpática, se puedan encontrar cambios en los niveles de segregación que podrían ser los desencadenantes de las modificaciones de la función simpática.

Estrés

Un estado fisiopatológico de hiperfunción simpática es el estrés. El estrés es un estado de hiperfunción en el que, a través de la participación del hipotálamo, se genera un incremento en la actividad del sistema simpático. Se sabe que diferentes estresores inducen diferentes patrones de activación del sistema nervioso simpático.

El estrés además de alterar la síntesis de catecolaminas en el sistema simpatoadrenomedular, afecta la función del sistema simpato-neural el cual inerva la mayoría de los órganos. Es por lo tanto de esperarse que la presencia y la distribución intracelular de los transmisores que participan en la transmisión ganglionar simpática se encuentren alterada en el estrés.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando la segregación entre Nts clásicos, así como su plasticidad en el GCS, resulta relevante develar la participación de estas propiedades neuronales en diferentes condiciones fisiopatológicas. Con ese objetivo, en este proyecto, se plantea analizar si existe alguna correlación entre cambios en la segregación de Nts y una condición fisiopatológica. En particular, se seleccionó una condición en la cual la actividad del SNS se encuentra exacerbada, como es el caso del estrés.

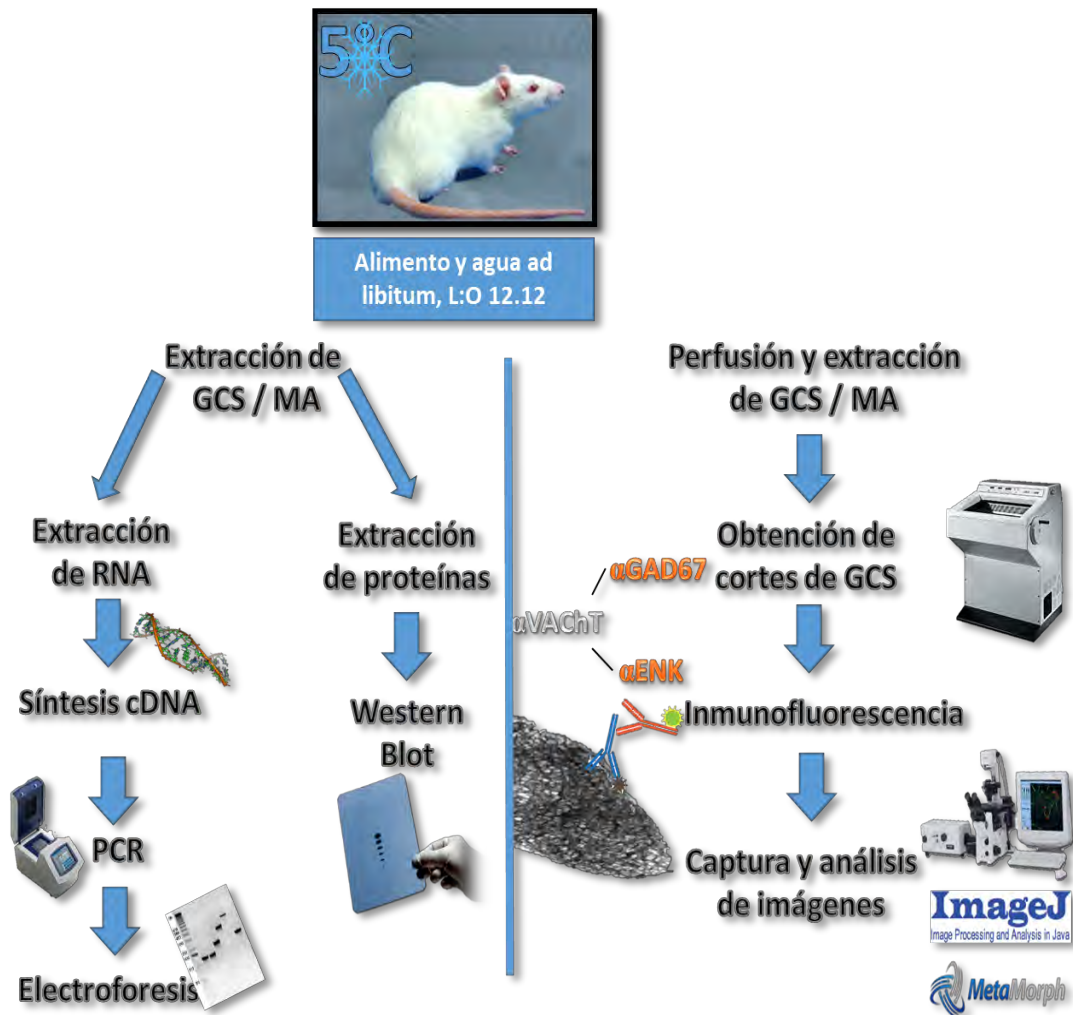
HIPÓTESIS

Los cambios en la función del sistema simpático que subyacen al estrés están correlacionados con cambios en la distribución y segregación de neurotransmisores en el GCS de la rata.

OBJETIVO

Analizar, a través de técnicas de inmunofluorescencia, los cambios en la segregación de GABA/ACh y mENK/ACh en neuronas presinápticas de GCS en ratas sometidas a estrés.

DISEÑO EXPERIMENTAL



Sujeto Experimental

Los experimentos se realizaron con ratas macho Wistar de 240-260 gramos de la Unidad de Modelos Biológicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de acuerdo a los lineamientos de la Guía Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Academia Nacional de Ciencias de los EUA y aprobado el 4 de agosto de 2014 por nuestro Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Protocolo No. 150)

Inducción de estrés por frío

Ratas machos Wistar de 8 a 9 semanas (240-260g) fueron mantenidos a una temperatura de 5° C, en condiciones controladas de 12 h ciclo luz-oscuridad con alimento y agua *ad libitum* durante 5 días.

RT-PCR

La expresión de mRNA de tirosina hidroxilasa (TH), tanto en GCS como en médula adrenal (MA) fue analizada a través de RT-PCR en animales control, así como sometidos a estrés.

Para la extracción de GCS y MA, las ratas fueron anestesiadas con xilazina (10 mg/kg i.m) y ketamina (100 mg/kg i.m). Inmediatamente después de la extracción, el tejido fue sumergido en nitrógeno líquido, para posteriormente ser triturado y homogenizado en trizol. El homogenado se centrifugó a 12,000 G 10' a 4°C, se recolectó el sobrenadante y se añadieron 200 µL de cloroformo por cada mL de trizol, se mezcló por inversión y se centrifugó a 12,000 G 10' a 4°C para separar las fases. Se removió y precipitó la fase acuosa superior para obtener el RNA total al adicionar 500 µL de isopropanol. Las muestras se incubaron 5' a temperatura ambiente y fueron centrifugadas a 12,000 G 10' a 4°C. El pellet de RNA fue lavado con 500 µL de etanol al 75% y posteriormente centrifugado durante 10' a 12,000 G a 4°C. Se disolvió el pellet de RNA en agua MQ estéril y se cuantificó el RNA total en Nanodrop. Las muestras fueron almacenadas a -70°C.

Para la retrotranscripción se utilizaron 1.5 µg de RNA total, 500 ng de random primers (Promega) y la transcriptasa reversa Superscript II (Life Technologies). La amplificación del cDNA se realizó con PCR Master Mix (Promega) con oligonucleótidos específicos diseñados para amplificar un fragmento de 645 pb del gen de TH y 236 pb del de actina, basados en el transcriptoma de *Rattus Norvegicus*.

TH (645 bp); T_M = 63°C

5'- GAA GGG CCT CTA TGC TAC CCA -3'

5'- TGG GCG CTG GAT ACG AGA -3'

Actina (236 bp); $T_M = 63^\circ\text{C}$

5'- GAG ACC TTC AAC ACC CC -3'

5'- GTG GTG GTG AAG CTG TAG CC -3'

Para la amplificación de ambos fragmentos se utilizó el siguiente programa:

	$^\circ\text{C}$	t
A	94	2'
B	94	30''
C	63	30''
D	72	30''
E	A x 20	
F	72	7'
G	4	∞

Se realizó la electroforesis de los productos de PCR en un gel de agarosa al 1.5% a 110 V durante una hora. El gel fue teñido con Bromuro de Etidio y digitalizado usando el escáner láser Typhoon FLA 9500. La intensidad de las bandas fue analizada mediante el uso del procesador de imágenes Image J.

Western Blot

Las ratas fueron anestesiadas con xilazina (10 mg/kg i.m) y ketamina (100mg/kg i.m). En cada sujeto experimental se realizó la extracción tanto de GCS como de MA, inmediatamente tras la extracción el tejido fue sumergido en nitrógeno líquido, y posteriormente homogenizado en buffer de lisis. El homogenizado fue centrifugado a 12,000 G durante 15 min a 4°C ; el sobrenadante fue recuperado y

almacenado a -20°C para posterior cuantificación de proteínas en Nanodrop por el método de BCA.

La electroforesis se realizó a 20 mA cargando 15 μg de proteína por carril en un gel de acrilamida al 12.5 %. La transferencia a membranas de nitrocelulosa se realizó a 110 V durante 80 min.

Las membranas se incubaron con PBS Tween 5% durante 2 hrs y posteriormente con el anticuerpo primario diluido en PBS Tween 5% durante 3 o 16 hrs.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

	Antisuero	Tipo de anticuerpo	Acoplado a	Dilución	Procedencia
Primarios	α -TH	Policlonal de ratón	...	1:15000	Millipore
	α -Actina	Policlonal de cabra	...	1:1000	Sta Cruz
Secundarios	α -IgG de cabra	Burro	HRP	1:10000	Bethyl
	α - IgG de ratón	Burro	HRP	1:10000	Millipore

Se hicieron lavados con PBS Tween 0.5% para eliminar los residuos del anticuerpo primario, después se incubó la membrana con el anticuerpo secundario (diluido en PBS Tween 5%) por 90 min.

Inmunofluorescencia

Los animales anestesiados profundamente con pentobarbital (10 mg/kg i.m) fueron perfundidos con una solución de para-formaldehído 2% y ácido pícrico 0.18% a través de la aorta ascendente. Se realizó la extracción de ambos GCS, así como de la porción correspondiente a los segmentos C8 a T4 de la médula espinal (ME). Se realizó la post-fijación y crioprotección (GCS: sacarosa 30%, ME: gradiente de sacarosa; 10, 20 y 30%). De cada ganglio se obtuvieron cortes longitudinales de 14 μm de grosor en un Criostato a 20°C ; los cortes fueron recuperados en laminillas hidrofílicas y procesados a temperatura ambiente en una atmósfera húmeda con

una técnica de rutina para inmunohistoquímica sencilla o doble. Debido a la baja eficiencia del anticuerpo primario contra el GAD67, y con el objetivo de aumentar la exposición del antígeno, los cortes fueron preincubados en solución de citratos Inmuno DNA Retriever” ([1:20]; Bio Sciences for the World, Santa Bárbara, CA, USA) durante una hora a 60 °C. El tejido fue incubado con solución de bloqueo (10% Suero de Albumina de Vaca) durante dos horas y, posteriormente, con los anticuerpos primarios correspondientes (diluidos en solución de bloqueo) durante 16 hrs.

Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

	Antisuero	Tipo de anticuerpo	Acoplado a	Dilución	Procedencia
Primarios	VChT	Policlonal de cabra	...	1:200	Immunostar
	GAD67	Policlonal de ratón	...	1:200	Millipore
	ChAT	Policlonal de cabra	...	1:200	Chemicon
	ENK	Policlonal de conejo	...	1:100	Millipore
Secundarios	α -IgG de cabra	Burro	ALEXA-488	1:200	Jackson
	α - IgG de ratón	Burro	ALEXA-594	1:400	Jackson
	α - IgG de conejo	Burro	ALEXA-594	1:400	Jackson

Se hicieron lavados con PBS Tx para eliminar el residuo del anticuerpo primario no ligado, después se incubaron los cortes con el anticuerpo secundario (diluido en PBS Tx) por 2 horas.

Como control, algunas secciones de tejido fueron procesadas por todos los pasos de incubación, sin la inclusión de los anticuerpos primarios. Finalmente, las secciones fueron cubiertas con medio de montaje para fluorescencia (Dako Fluorescent Mounting medium, Dako, Santa Clara, CA, USA) y examinados con un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse E600), equipado con los filtros apropiados para Alexa 488, Alexa 594 y Cy5. Cortes seleccionados con uno o dos marcajes fueron analizados posteriormente con un microscopio confocal LSM 5 Pascal Zeiss equipado con un láser argón/Krypton. Las imágenes fueron capturadas

con un objetivo 40x (1.3 NA/Oil), las imágenes confocales fueron obtenidas utilizando por lo menos dos canales fotomultiplicadores separados, ya sea juntos o en corridas separadas.

Evaluación de la expresión e inmunoreactividad

Se examinaron entre 20 y 30 imágenes (obtenidas mediante muestreo aleatorio) por corte de GCS. Las imágenes fueron deconvolucionadas usando el programa de procesamiento de imágenes Metamorph. Mediante el uso de Image J se establecieron umbrales en los valores de intensidad para detectar los botones positivos a GAD67, ENK y VACHT.

Posteriormente identificamos marcas específicas al seleccionar la densidad óptica (DO) que sobresale sobre la marca de fondo (p.e $DO > \text{promedio de la densidad óptica del fondo} + 2 \text{ DE}$). Cuantificamos el número de píxeles sobrelapados para cada marcador en las varicosidades con doble inmunomarca. La colocación es presentada como la razón entre el porcentaje del área de las fibras que coexpresan las dos marcas, y el relativo al porcentaje del área de las fibras que sólo expresan un marcador. Es por ello que la razón de uno corresponde a la colocación completa mientras que la de cero representa localización completamente independiente. La segregación de dos marcas fue representada como el porcentaje de varicosidades que expresan un marcador dado (p.e. GAD 67) que no expresan un segundo marcador (VACHT). Entonces, 100% de la segregación indica que ninguna de las varicosidades, en un corte con dos marcadores, expresan ambos marcadores, mientras que 0% indica que todas las varicosidades expresan a ambas marcas.

Los datos fueron expresados como promedios \pm SEM. El nivel de significancia para las diferencias entre los promedios fue evaluado por una t-student independiente. El nivel de significancia fue fijado a $P < 0.05$.

RESULTADOS

Pérdida de masa corporal en ratas sometidas a estrés

Para confirmar el estrés de los animales, al inicio y al final del tratamiento de inducción de estrés se registraron tanto la masa del animal como la cantidad de alimento consumido. Nuestros datos muestran que después de 5 días de ser expuestas a una temperatura de 5°C (con comida y agua *ad libitum*) el grupo experimental presentó una disminución de masa de 10 ± 2.3 g; mientras que en condiciones control durante los 5 días correspondientes al tiempo de

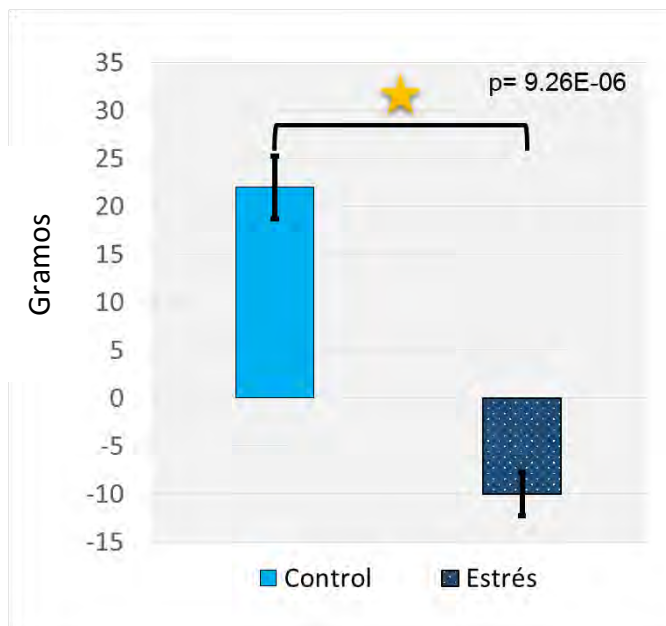


Figura 4. Cambios en la masa corporal de ratas Wistar sometidas a estrés y su grupo control. Los resultados se muestran como Promedio \pm Error. Estadística de prueba: t, $\alpha=0.05$, $gl=25$, $p<0.05$

exposición al frío, los animales presentaron un aumento de 22 ± 3.3 g (**Figura 4**). Se confirmó que esta disminución en la masa corporal no es consecuencia de un cese en la ingesta de alimento dado que, a lo largo de los 5 días del tratamiento, cada individuo del grupo experimental consumió 136 ± 2.2 g de alimento.

La expresión de TH aumenta en la MA de ratas sometidas a estrés

A través de RT-PCR se analizaron los niveles de expresión del mensajero de TH y como control el de actina. En comparación con el grupo control ($n=9$) la relación entre la expresión del mensajero de TH y del de actina en el grupo sometido a estrés ($n=11$) aumentó en un 17.59% (**Figura 5**).

La expresión proteica de TH y actina fue evaluada a través de Western Blot. En ratas control el promedio de la relación entre la expresión de TH y actina fue de 0.98 ± 0.06 , y en el grupo sometido a estrés 1.63 ± 0.06 .

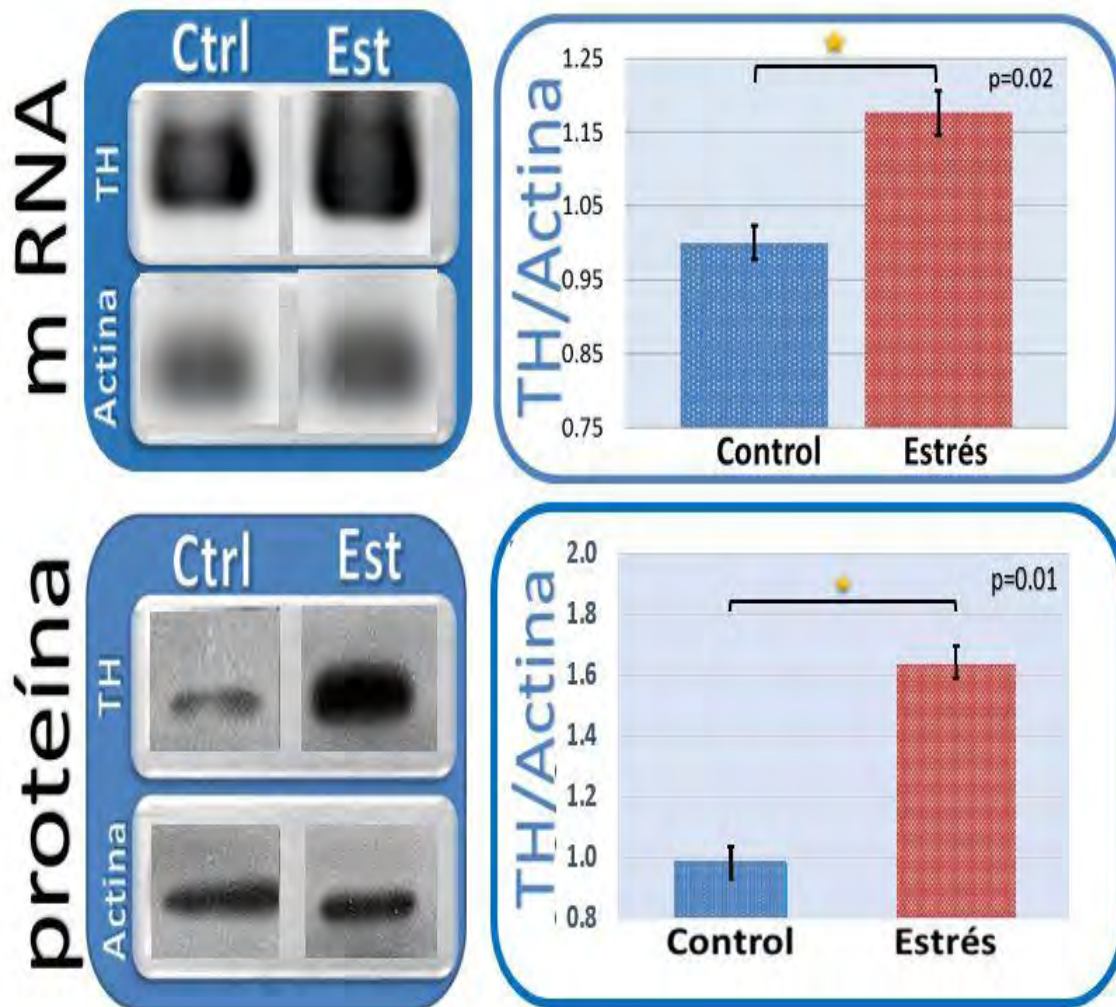


Figura 5. Cambios en la expresión de TH en MA como consecuencia de la inducción de estrés. Cambios en la expresión de RNA mensajero y proteína de TH. Los resultados se muestran como el Promedio \pm SEM de la razón geométrica de la densidad óptica de TH y actina. Estadística de prueba: t, $\alpha=0.05$, $gl=17$ (mRNA) y 7 (proteína), $p<0.05$

Coincidiendo con varios estudios, nuestros datos muestran que en la MA de ratas sometidas a estrés hay un incremento estadísticamente significativo de la expresión de TH, tanto a nivel de mRNA como de proteína (Kvetnansky & Sabban, 1993; Liu *et al*, 2005; Ulus & Wurtman, 1978).

Co-expresión de ACh-GABA y ACh-ENK en neuronas preganglionares simpáticas

Con el objetivo de confirmar que las terminales analizadas en el GCS corresponden a neuronas que coexpresan ACh y mENK o ACh y GABA, a través de técnicas de inmunofluorescencia, se comprobó que todos los somas de las NPS GABAérgicas son también inmunopositivas a ChAT (**Figura 6**). Debido al transporte anterógrado axonal, en médula espinal de ratas control no es posible la detección de GAD67 o mENK sin la administración de un inhibidor del transporte celular (ej. colchicina) (Elinos, 2016). Sin embargo, debido al incremento de GAD67 en los cuerpos celulares de las NPS en el grupo experimental, fue posible analizar la expresión de GAD67 en el soma de NPS, sin el uso de algún inhibidor del transporte celular (**Figura 6C**). Es posible que las condiciones de estrés inducidas en este trabajo incrementen la expresión de GAD67 en el cuerpo celular y que, a su vez, afecten el transporte axonal de esta enzima.

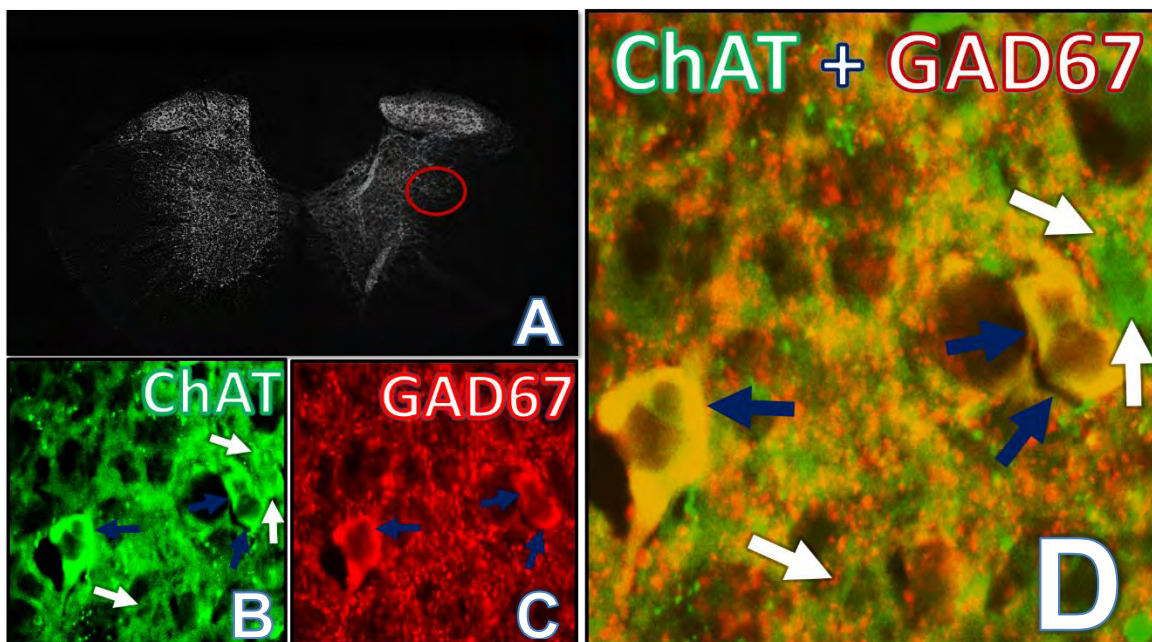


Figura 6. Co-expresión de ChAT y GAD67 en NPS del grupo experimental. Fotomicrografía de inmunofluorescencia con marcadores para ChAT (B) y GAD67(C) realizada en cortes de médula espinal (C8 – T4). Las NPS, ubicadas en el núcleo intermedio lateral (A) co-expresan ACh y GAD67. Las flechas blancas señalan células inmunopositivas ChAT (B y D), mientras que las azules señalan células inmunopositivas a ambos marcadores (B, C, D).

De la misma manera, confirmamos que todos los somas de las NPS inmunopositivos a mENK son también inmunopositivos a ChAT (**Figura 7**) (Sámano, 2009; Vega, 2015).

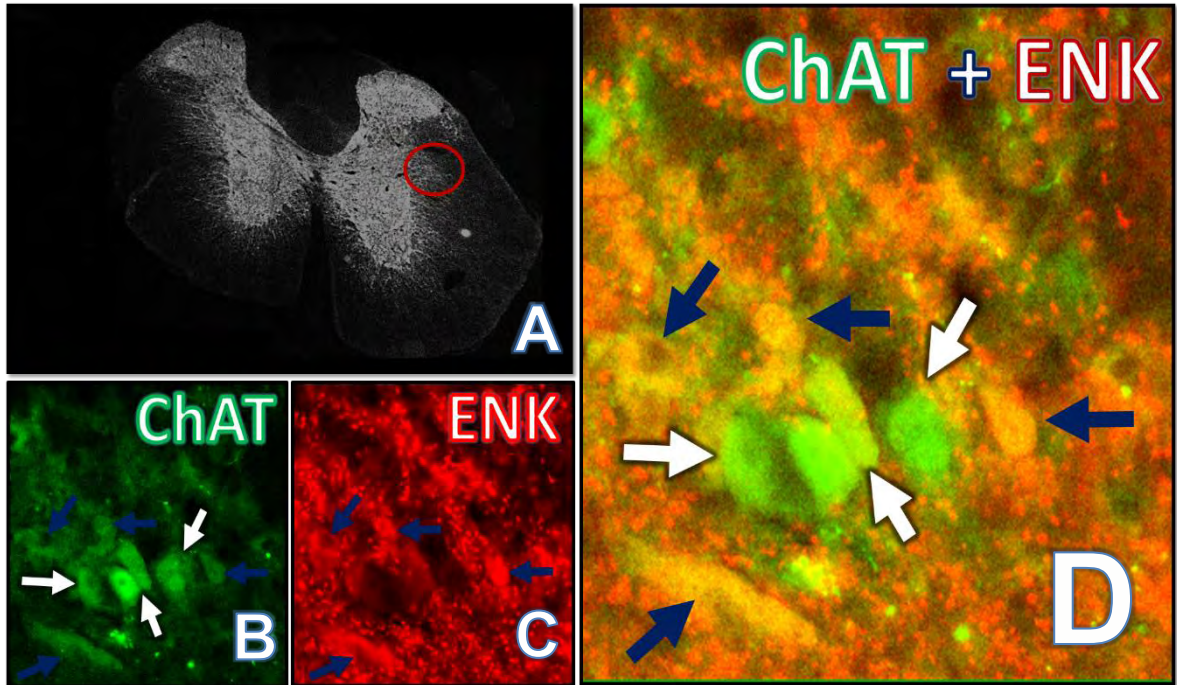


Figura 7. Co-expresión de ChAT y ENK en NPS del grupo experimental. Fotomicrografía de inmunofluorescencia con marcadores para ChAT (B) y ENK (C) realizada en cortes de médula espinal (C8 – T4). Las NPS, ubicadas en el núcleo intermedio lateral (A) co-expresan ACh y ENK. Las flechas blancas señalan células inmunopositivas ChAT (B y D), mientras que las azules señalan células inmunopositivas a ambos marcadores (B, C, D).

Los resultados anteriores (**Figura 6** y **Figura 7**) confirman que los botones analizados en el GCS corresponden a NPS que coexpresan ACh-GABA y ACh-mENK (Elinos, 2016; Vega, 2015; Sámano, 2009).

Cambios en la expresión de neurotransmisores en GCS de ratas sometidas a estrés

Nuestros resultados muestran que, al comparar contra el control, en el modelo de inducción de estrés por exposición prolongada al frío no hay cambios significativos en la expresión de VAcHT en terminales de neuronas preganglionares simpáticas

(Figura 8G). Por otra parte, el análisis de la expresión de GAD67 muestra resultados contradictorios ya que, en comparación al control, en el grupo experimental se encontró un incremento en la expresión de GAD67 (Figura 6) en los somas de las neuronas preganglionares, sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión de GAD67 en las terminales de estas neuronas (Figura 8I).

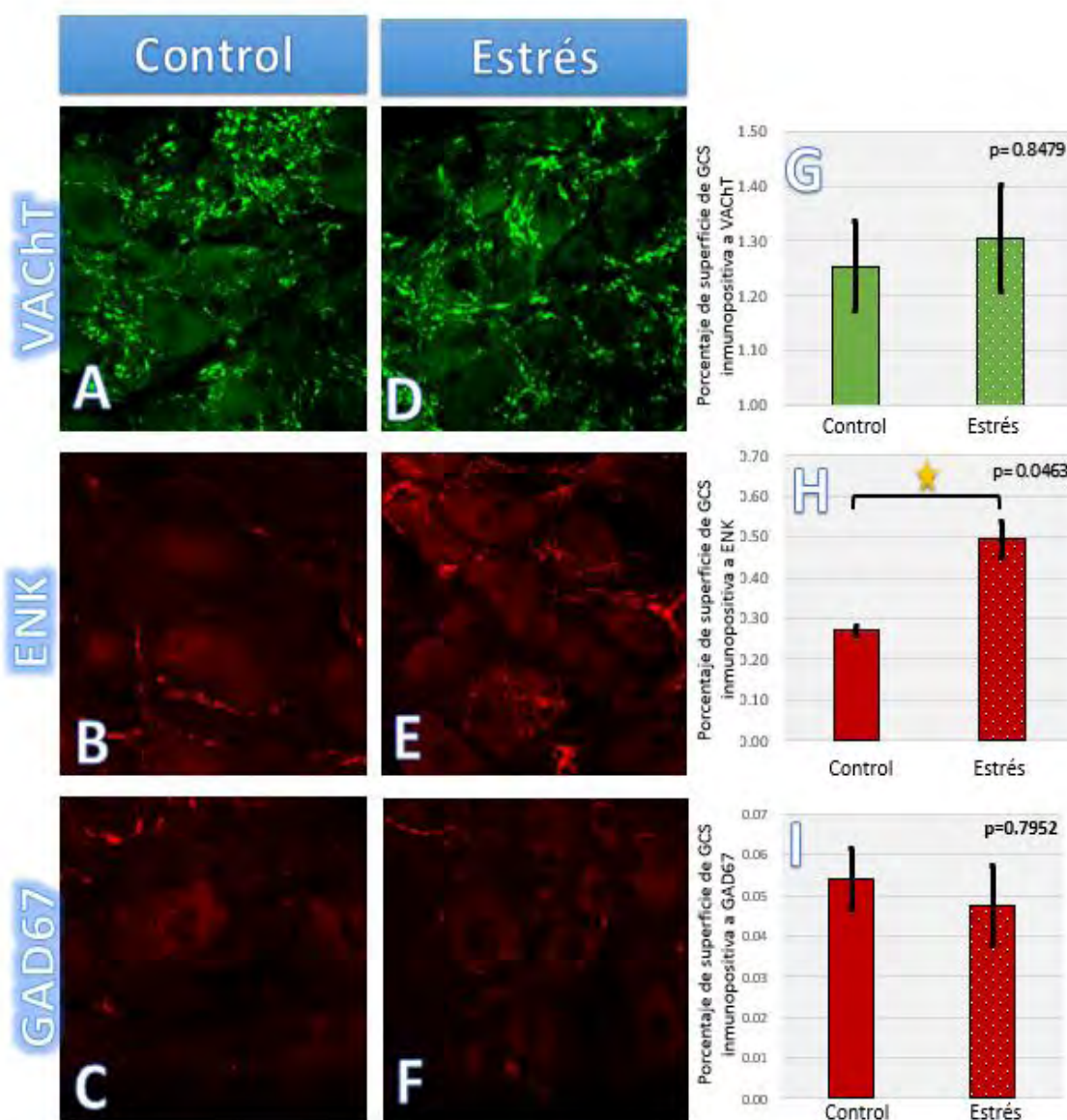


Figura 8. Cambios en la expresión de VACHT, ENK y GAD67 en terminales de NPS como consecuencia de la inducción de estrés. Porcentaje de la superficie de GCS inmunopositiva a VACHT (A y D), ENK (B y E) y a GAD67 (C y F). Los resultados se muestran como Promedio ± SEM. Estadística de prueba: t, $\alpha=0.05$. $gl=15$ (G), 6 (H), 19 (I), $p<0.05$

Además, nuestros datos revelan un aumento significativo de la expresión de mENK, el cual abarca el $0.5\% \pm 0.04$ de la superficie del GCS examinada, 0.23% más que en terminales de NPS del grupo control (**Figura 8H**).

Cambios en la segregación de neurotransmisores en GCS de ratas sometidas a estrés

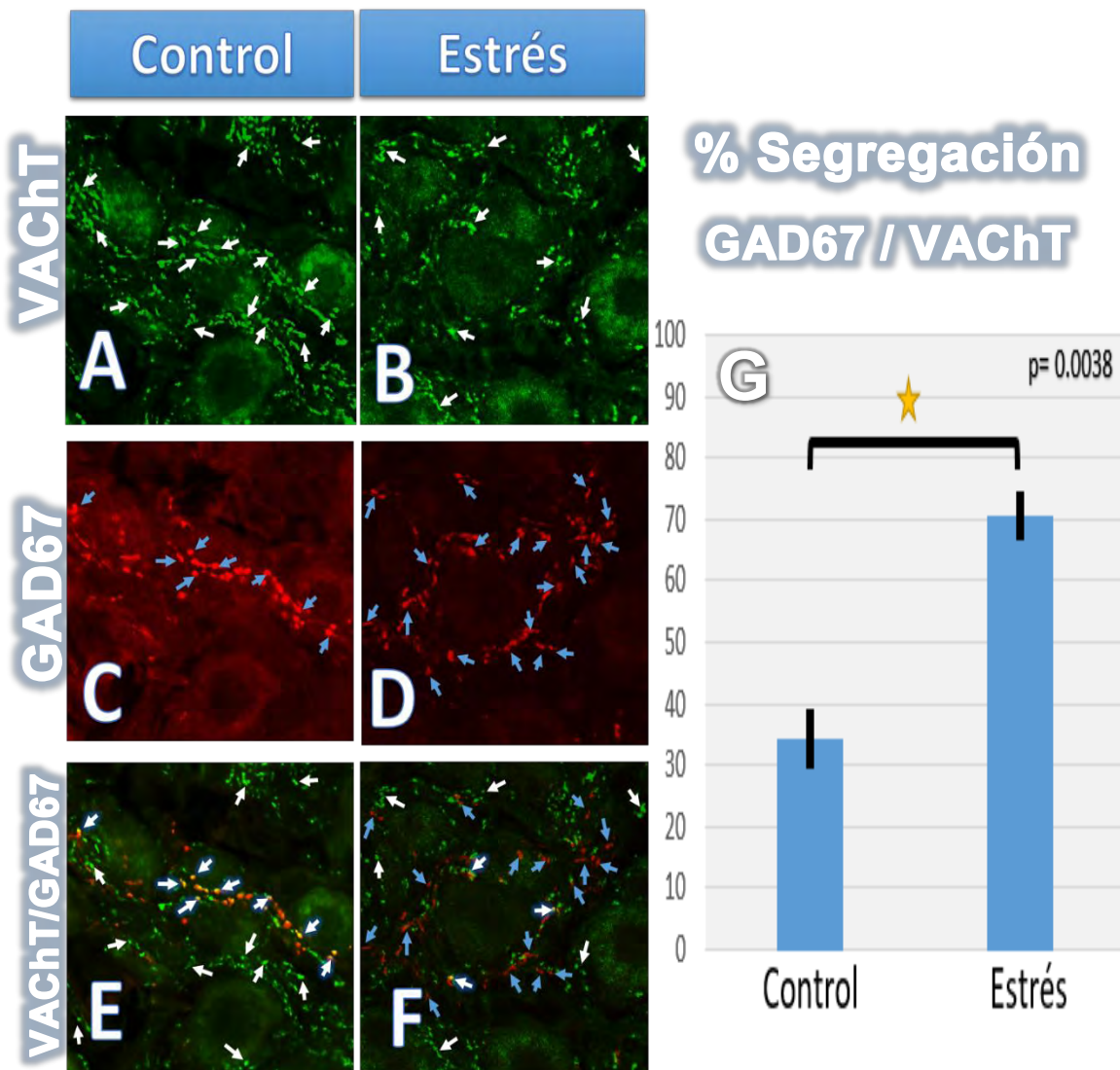


Figura 9. Cambios en la segregación de VACHT y GAD67 en terminales de NPS como consecuencia de la inducción de estrés. Fotomicrografía de inmunofluorescencia con marcadores para VACHT (**A, D**) y GAD67 (**B, F**) realizada en cortes de GCS. Las flechas blancas señalan botones inmunopositivos a VACHT, las flechas azules señalan botones inmunopositivos a GAD67 y las azul con blanco señalan botones positivos a ambos marcadores (**C, F**). El porcentaje de segregación (**G**) se obtuvo al obtener el complemento de la proporción de colocalización. La proporción de colocalización fue calculada mediante la cuantificación del área correspondiente a los botones en que colocalizan ambos marcadores. Los resultados se muestran como $\mu \pm$ SEM. Estadística de prueba: t, $\alpha=0.05$ gl=7, $p<0.05$

En neuronas preganglionares simpáticas del grupo control se encontró segregación de GABA respecto a VACHT, al hallar que sólo el 66.6% del área correspondiente a la expresión de GAD67 es también positiva para la expresión de VACHT, es decir, sólo hay segregación del 34.4% (**Figura 9**).

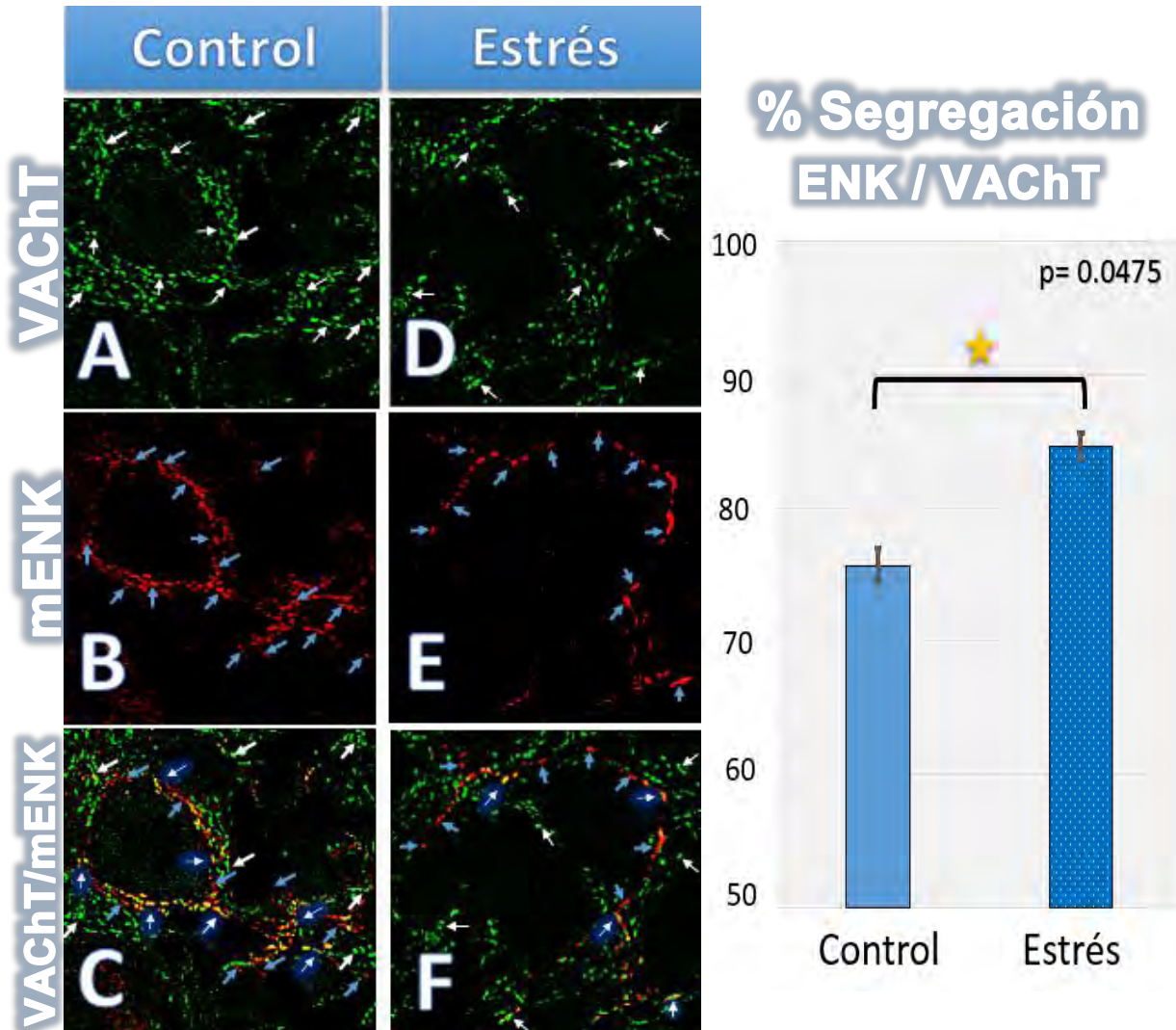


Figura 10. Cambios en la segregación de VACHT y mENK en terminales de NPS como consecuencia de la inducción de estrés. Fotomicrografía de inmunofluorescencia con marcadores para VACHT (**A, D**) y mENK (**B, F**) realizada en cortes de GCS. Las flechas blancas señalan botones inmunopositivos a VACHT, las flechas azules señalan botones inmunopositivos a mENK y las azul con blanco señalan botones positivos a ambos marcadores (**C, F**). El porcentaje de segregación (**G**) se obtuvo al obtener el complemento de la proporción de colocalización. La proporción de colocalización fue calculada mediante la cuantificación del área correspondiente a los botones en que colocalizan ambos marcadores. Los resultados se muestran como $\mu \pm$ SEM. Estadística de prueba: t, $\alpha=0.05$, gl=6, $p<0.05$

Por otro lado, en NPS de ratas sometidas a estrés hay un aumento significativo en la segregación de GAD67 de VACHT; el valor control de 34.4% incrementó a el 69.9% del área inmunopositiva a GAD67 no se expresa VACHT (**Figura 9**).

Además, se halló que en NPS del grupo control la segregación de mENK respecto a VACHT (**Figura 10**), fue de 76 ± 0.05 %, mientras que la hallada en el grupo sometido a estrés presentó un aumento de casi el 10% (85 ± 0.04 %; **Figura 10**).

DISCUSIÓN

Según reportes previos en la literatura (Kvetnansky & Sabban, 1993; Liu *et al*, 2005; Ulus & Wurtman, 1978), el aumento en los niveles de TH (mRNA y proteína) en MA, así como una disminución en la masa corporal de ratas de nuestro grupo experimental, valida la eficacia de nuestro modelo en la inducción de estrés.

Además de confirmar la segregación de GABA/ACh y de mENK/ACh en animales control, nuestros datos revelan un claro aumento en la segregación de GABA y mENK respecto a ACh. Estos resultados sugieren que los cambios en la función del sistema simpático que subyacen al estrés podrían estar correlacionados con cambios en la distribución y segregación de neurotransmisores como la ACh, mENK y GABA en las NPS de la rata. ‘

En un trabajo reciente del laboratorio se encontró una correlación entre los niveles de co-existencia vs segregación de ACh y GABA con los niveles de inhibición de la transmisión ganglionar. A mayor coexistencia y menor segregación se encontró mayor inhibición (Elinos *et al*, 2016). Una explicación sugerida fue que al coexistir y posiblemente coliberarse el GABA con la ACh consigue inhibir más eficientemente la transmisión colinérgica. Por el contrario, la predominancia de segregación sobre co-existencia condiciona una menor inhibición, posiblemente porque el GABA liberado independientemente desde botones separados a los colinérgicos resulta menos eficiente para ejercer la inhibición de la transmisión ganglionar (Elinos *et al*, 2016). De acuerdo a estas propuestas en el estrés agudo estudiado en este trabajo se generaría un aumento de la segregación de GABA y ACh lo que resultaría en una reducción del efecto inhibitor GABAérgico dando lugar a la hiperactividad simpática que caracteriza la condición de estrés.

A pesar de que no se hallaron diferencias significativas en la presencia de ACh y GABA entre el grupo experimental y el control, si se halló un incremento significativo en la presencia de mENK en el grupo sometido a estrés. Este incremento en mENK (péptido opioide de naturaleza inhibitoria), podría señalar un mecanismo por el cual el sistema nervioso simpático intenta contrarrestar el estado de hiperactividad

neuronal que se origina como consecuencia del sometimiento a estrés (Ulus & Wurtman, 1978; Kvetnansky & Sabban, 1993, Kvetnansky *et al*, 2013).

Estos resultados, además de evidenciar una correlación entre cambios en los niveles de segregación y condiciones fisiopatológicas como el estrés, aportan un nuevo ángulo de estudio para la patología del estrés, ya que presenta un mecanismo hasta ahora inexplorado en esta condición: la segregación de Nts. Sería de esperarse que la plasticidad de la segregación de neurotransmisores estuviera correlacionada con cambios en la actividad de las neuronas postganglionares y que estos cambios obedecieran a variaciones en las necesidades de los órganos blanco, sobre todos aquellos íntimamente relacionados con la respuesta a estresores físicos.

La exposición prolongada o repetida al estrés ha sido reconocida como un factor de riesgo para el desarrollo de hipertensión, infarto al miocardio y depresión. Además, el estrés es capaz de acelerar la progresión de otras patologías como la diabetes o el cáncer. (Chrousos & Gold, 1992, McEwen, 2002; Liu *et al*, 2005).

CONCLUSIONES

-La eficacia del modelo de estrés por exposición al frío utilizado en este trabajo queda confirmada tanto por la pérdida de masa corporal como por el incremento en los niveles de TH (mRNA y proteína) en la MA del grupo experimental.

-En el modelo de inducción de estrés por exposición al frío, las NPS presentan un incremento en la segregación de GABA/ACh y mENK/ACh. Mientras que el aumento en la segregación de mENK/ACh es de tan sólo el 10%, el aumento en la segregación de GABA y ACh (cuyos valores se duplicaron en condiciones de estrés) pudiera favorecer una reducción del efecto inhibitorio GABAérgico que contribuiría a generar la hiperfunción simpática que caracteriza al estrés.

-En GCS de ratas sometidas a estrés no hay cambios significativos en la expresión de ACh y GABA, pero si en la expresión del cotransmisor inhibitorio ganglionar mENK. Este aumento pudiera ser parte de un mecanismo para contrarrestar el estado de hiperactividad neuronal resultado del estrés.

Nuestro trabajo muestra al estudio de la presencia y distribución intracelular de neurotransmisores como una nueva vertiente para el análisis de la fisiopatología del estrés.

ANEXOS

Sistema Nervioso Periférico

El sistema nervioso de los vertebrados tiene dos divisiones principales: el sistema nervioso central (SNC) y el periférico (SNP). Mientras que el SNC consta de un encéfalo que es continuo con la médula espinal, el SNP está formado por receptores sensoriales, nervios aferentes que llevan la señal sensorial al SNC y en la parte motora por los nervios que conducen las señales del SNC a los órganos efectores (**Figura A1**). El SNP, a su vez, se divide en somático y autónomo.

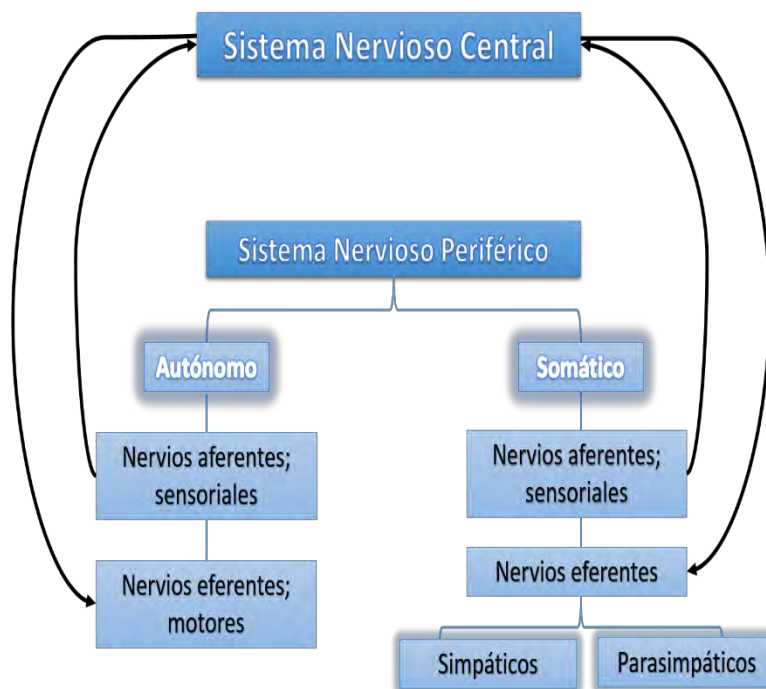


Figura A1. División del sistema nervioso de vertebrados. Las flechas negras indican la dirección del flujo de información

La división somática del SNP controla la respuesta del cuerpo ante cambios en el ambiente externo. Mientras que los nervios y receptores que mantienen la homeostasis constituyen la división autónoma.

La división autónoma regula principalmente la presión arterial, la función cardíaca, las secreciones exocrinas y la motilidad gastrointestinal. Esta tiene tres tipos de vías eferentes:

entérica, simpática (**Figura A2**) y parasimpática.

La división entérica está conformada por neuronas localizadas en la pared intestinal, y controla la motilidad, secreción y absorción intestinal.

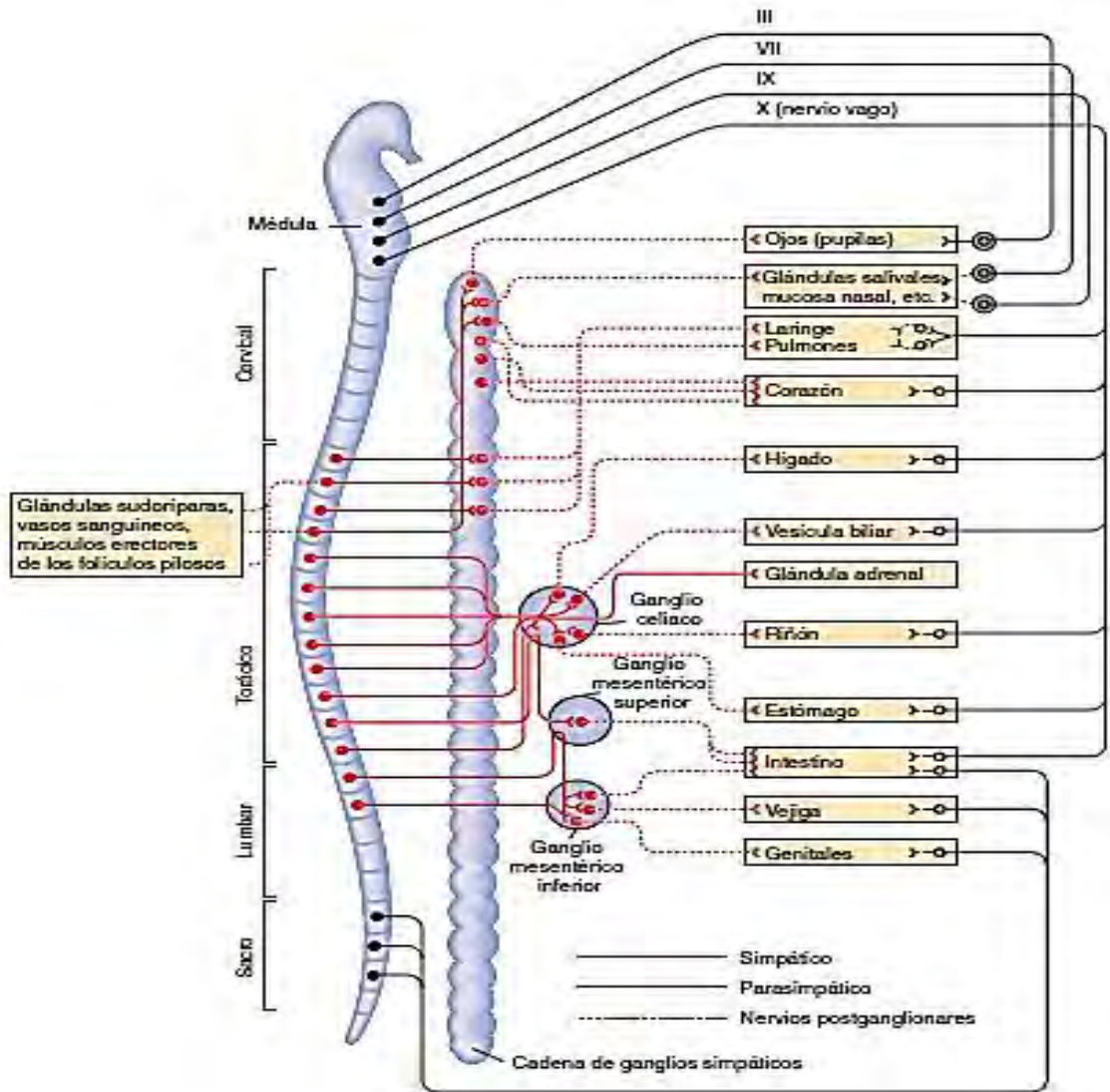


Figura A2 Sistema Nervioso Simpático (Solomon, 2008).

La mayoría de los órganos se encuentran inervados tanto por nervios simpáticos como parasimpáticos; en general, los sistemas simpático y parasimpático tienen efectos antagónicos. En muchos casos, los nervios simpáticos operan para estimular órganos y movilizar energía, en especial en respuesta al estrés; por otro lado, los nervios parasimpáticos propician la conservación y restauración de energía. En el sistema nervioso autónomo la vía eferente usa un sistema de relevo de dos neuronas entre el SNC y el órgano efector. La primera neurona, denominada neurona preganglionar, tiene su cuerpo y dendritas dentro del SNC y su axón (parte de un nervio periférico), establece sinapsis con una neurona postganglionar. Las

dendritas y el soma de esta neurona yacen en el ganglio autonómico, fuera del SNC; finalmente su axón hace sinapsis con el órgano efector (Sámano, 2009; Solomon *et al*, 2013).

Estrés

En general, el estrés ha sido definido como una modificación en el entorno que cambia o amenaza con cambiar un estado fisiológico dinámico y óptimo existente. (Barret *et al*, 2010)

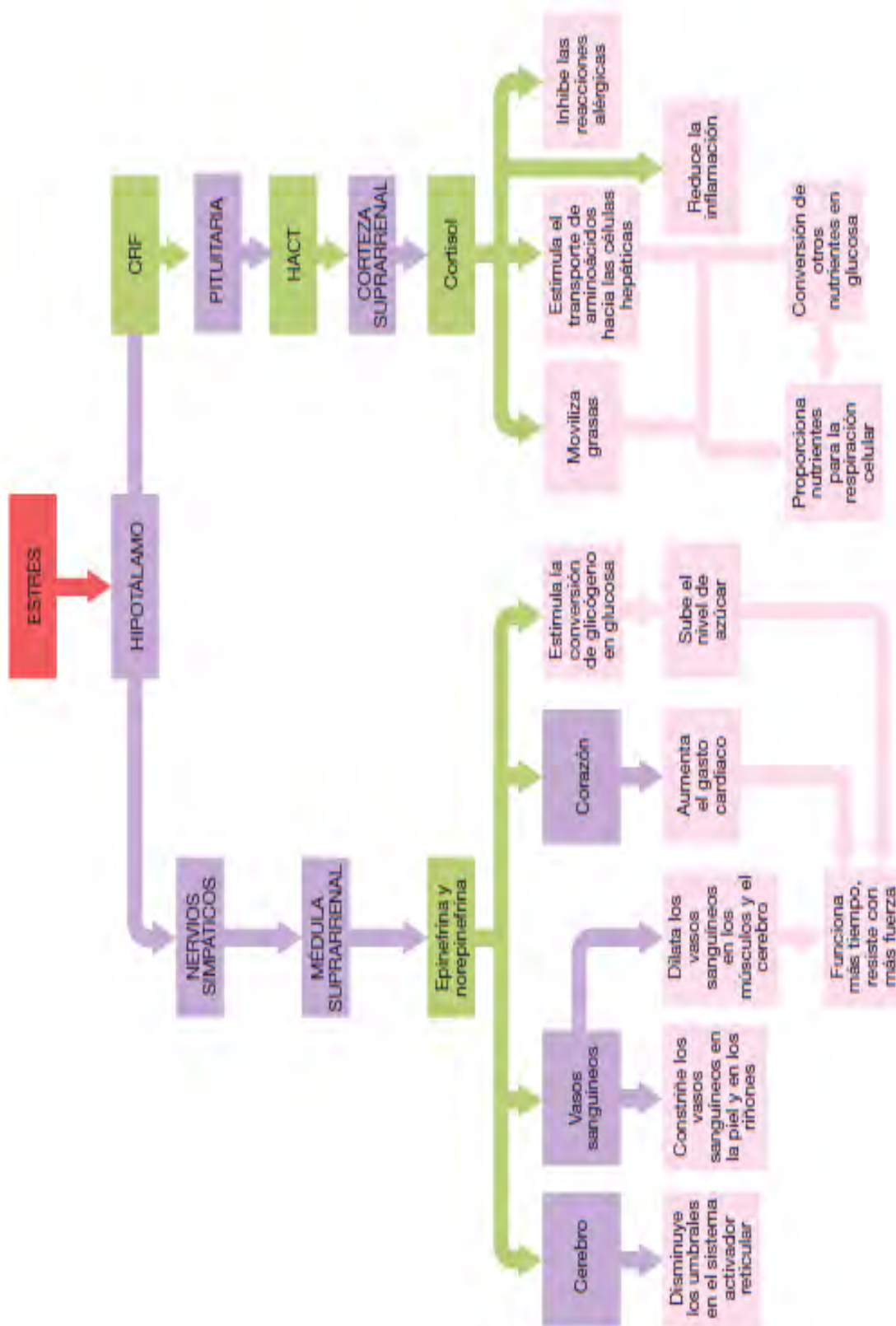
En 1936, Selye describe el agrandamiento adrenal, la ulceración gastrointestinal y la involución timicolinfática como respuestas evocadas por cualquier estresor. En 1989, Vigas propone que las respuestas al estrés son específicas a cada tipo de estresor, modificando la teoría del estrés de Selye.

En general, los estresores pueden dividirse en cuatro categorías:

- Físicos. Calor, radiación, ruido, vibración, estresores químicos, dolor e inmovilización.
- Psicológicos. Inducen cambios en la conducta, tales como Ansiedad, miedo o frustración.
- Sociales.
- Estresores que ocasionan disrupción de la homeostasis metabólica y cardiovascular. Ejercicio, ortostasis, hipoglicemia y hemorragia.

La **figura A3** describe la respuesta general del organismo ante el estrés, sin embargo, es importante considerar que diferentes estresores inducen diferentes patrones de activación del sistema nervioso simpático.

El estrés crónico puede conducir a un incremento en los niveles de glucocorticoides y a una activación prolongada del sistema nervioso simpático. Además, ha sido asociado con la acumulación de grasa visceral, con la diabetes tipo II, y con trastornos cardiovasculares. (Kvetnansky *et al*, 2013; Solomon *et al* 2013).



CRF: Factor liberador de corticotropina

HACT: Hormona adrenocorticotrópica

Figura A3 Respuesta general al estrés (Solomon, 2008).

Sistema Nervioso Simpático y Estrés

El sistema nervioso simpático no sólo regula las respuestas cardiovasculares y metabólicas ante el estrés, sino que también presenta alteraciones bajo situaciones de estrés.

En contraste con el concepto de sistema unitario simpatoadrenal de Canon, que establecía que la médula adrenal y el sistema nervioso simpático funcionan como unidad, existen varios sistemas catecolaminérgicos que son regulados por varios estresores. El sistema periférico simpático consiste de

- a) Sistema simpatoadrenomedular
- b) Sistema simpatoneural
- c) Sistema autocrino/paracrino DOPA/dopamina
- d) Sistemas catecolaminérgicos no neurales

El estrés altera la síntesis de catecolaminas en el sistema simpatoadrenomedular, MA, a través de tres enzimas clave: hidroxilasa de tirosina (TH), dopamina beta hidroxilasa (DBH) y feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT). Las enzimas de la vía de síntesis de las catecolaminas son inducidas a través de distintas vías de señalización en respuesta a estresores de corto y largo plazo (exposición al frío o inmovilización).

La MA produce alrededor del 80% de adrenalina y el 20% de noradrenalina. Las células cromafines de la MA están inervadas por las neuronas preganglionares simpáticas de la columna intermediolateral, principalmente por los segmentos torácicos T5 y T9. La MA responde a estresores como inmovilización, hipoglicemia, shock y miedo.

Después de ser sometidos a repetidas exposiciones del mismo estresor, los niveles de catecolaminas regresan a niveles basales e incluso se establecen niveles basales más altos.

El principal transmisor del sistema simpato-neural es la adrenalina, Las neuronas postganglionares del sistema simpato-neural inervan la mayoría de los órganos y producen y liberan noradrenalina. El sistema simpato-neural está implicado en muchas respuestas fisiopatológicas al estrés como la hipertensión o las arritmias cardiacas. El sistema simpato-neural responde a estresores como la exposición al frio, ejercicio, hipotensión, hemorragia, dolor e hipovolemia.

El mecanismo de liberación y síntesis de catecolaminas es similar en la MA y las terminales nerviosas simpáticas. La síntesis de catecolaminas es dependiente de la actividad de la enzima TH (Tyrosine hydroxilase). La ACh liberada desde las terminas preganglionares simpáticas se une a receptores nicotínicos, conduciendo a la despolarización de la membrana, incrementando su permeabilidad a Na. Esto resulta en un incremento del influjo de Ca, permitiendo que las vesículas que contienen catecolaminas se fusionen con la membrana celular de las células cromafines/simpáticas y liberen su contenido en el espacio extracelular. Después de la exocitosis las catecolaminas que escapan de la recaptura y el metabolismo local, difunden a la circulación y constituyen la posa circulante de catecolaminas.

Un aspecto importante a considerar es que la respuesta del organismo ante el mismo estresor fisiológico no siempre es la misma, sino que es influenciada por muchos factores, incluyendo diferencias individuales, factores genéticos y experiencia previa con el mismo u otro estresor. (Liu *et al*, 2005; Kvetnansky *et al*, 2013)

REFERENCIAS

Barret KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL (2010) Médula y corteza suprarrenales. En: Ganong, Fisiología Médica 23a Edición. Pp 350-351

Blitz DM & Nusbaum MP (1999) Distinct functions for cotransmitters mediating motor pattern selection. *Journal of Neuroscience* 19, 6774 -6783.

Burnstock G (1976). Do some nerve cells release more than one transmitter? *Neuroscience* 1, 239-248.

Burnstock G (2004). Cotransmission. *Current Opinion in Pharmacology*, 4:47-52.

Chrousos GP, Gold PW (1992) The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis, *JAMA* 267: 1244 – 1252.

Eccles JC, Eccles RM, Fatt P (1956) Pharmacological investigations on central synapse operated by acetylcholine. *J Physiol* 131: 154-169 .

Eccles JC (1957) The physiology of nerve cells. John Hopkins Press. Baltimore and Oxford University Press, 270.

Elinos D, Rodriguez R, Martínez LA, Zetina ME, Cifuentes F, Morales MA (2016) Segregation of acetylcholine and GABA in the rat superior cervical ganglio: Functional correlation. *Front. Cell. Neurosci.* 10, 91.

Itto T, Satoshi I, Nojyo Y (2005) A part of cholinergic fibers in mouse superior cervical ganglia contain GABA or glutamate. *Brain Research* 1046 235-238.

Jaim-Etcheverry G, Zieher LM (1969) Ultrastructural cytochemistry and pharmacology of 5-hydroxytryptamine in adrenergic nerve endings. I. Localization of exogenous 5-hydroxytryptamine in the autonomic nerves of the rat vas deferens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 166, 264-271.

Kvetnansky R, Lu X, Ziegler MG. (2013) Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems. *Advances in Pharmacology*, Volume 68, 1054

Kvetnansky R & Sabban EL (1993) Stress-induced changes in tyrosine hydroxylase and catecholamine biosynthetic enzymes. S. Parvez (Ed), *Tyrosine hydroxylase: From Discovery to Cloning*, VSP, Utrecht, 311.

Levitan IB & Kaczmarek K (2008) *The Neuron: Cell and Molecular Biology*, 3rd Edition, 600.

Lindh B, Staines W, Hokfel T, Terenius L, Salvaterra PM (1986) Immunohistochemical demonstration of choline acetyltransferase-immunoreactive preganglionic nerve fibers in guinea pig autonomic ganglia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 5316-5320.

Liu X, Kvetnansky R, Serova L, Sollas A, Sabban EL (2005) Increased susceptibility to transcriptional changes with novel stressor in adrenal medulla of rats exposed to prolonged cold stress. *Molecular Brain Research* 141: 19 -29.

Loewi O (1921) Über humorale Übertragbarkeit der Herznervenwirkung. I Mitteilung. *Pflügers Arch Ges Physiol* 189: 239 – 242.

McEwen BS (2002) Protective and damaging effects of stress mediators: the good and bad sides of the response to stress. *Metabolism*, 51: 2-4

Morales MA, Holmberg K, Xu Z, Cozzari C, Hartman B, Emson P, Goldstein M, Elfin L, Hokfelt T (1995). Localization of the choline acetyltransferase in rat peripheral sympathetic neurons and its coexistence with nitric oxide synthase and neuropeptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 11819-11823.

Nishimaru H, Restrepo C, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O. (2005) Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 102 (14): 5245 -5249

Owman C (1964). Sympathetic nerves probably storing two types of monoamines in the rat pineal gland. *International Journal of Neuropharmacology* 2, 105-112.

Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Hall WC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM (2008). *Synaptic Plasticity*. En : *Neuroscience*, 4th Edition. Pp : 85 -119

Rayport S, (2001) Glutamate is a cotransmitter in ventral midbrain dopamine neurons. *Parkinsonism Relat Disord* 7 (3): 261 -264

Sámano C, Zetina ME, Marín MA, Cifuentes F, Morales MA (2006). Choline acetyl transferase and neuropeptide immunoreactivities are colocalized in somata, but preferentially localized in distinct axón fibers and boutons of cat sympathetic preganglionic neurons. *Synapse* 60 (4) 295 -306.

Sámano C, (2009) Segregación de transmisores y cotransmisores en neuronas preganglionares simpáticas. Tesis de Doctorado, Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, 109.

Sámano C, Cifuentes F y Morales MA (2012). Neurotransmitter Segregation: Functional and Plastic Implications. *Progress in Biology*. No. 97. Pp 277 -287

Sherrington CS (1897) En: *Foster's Textbook of Physiology*, 7a Edición, 366.

Sherrington CS (1906) *The integrative action of the nervous system*. Charles Scribner's Sons, 411.

Solomon EP, Berg LA, Martin DW (2008) *El Sistema nervioso de los vertebrados: estructura y función*. En: *Biología*, 8ª Edición. Pp 884-885.

Solomon EP, Berg LA, Martin DW (2008) Regulación Endocrina. En: Biología, 8ª Edición. Pág 1047

Sossin WS, Sweet-Cordero A, Scheller RH (1990) Dale's hypothesis revisited: Different neuropeptides derived from a common prohormone are targeted to different processes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, Págs 4845 – 4848

Twarog BM, Page IH (1954) Serotonin content of some mammalian tissues and urine and method for its determination. Am J Physiol 175: 157-161

Ulus IH & Wurtman (1978) Selective response of rat peripheral sympathetic nervous system to various stimuli. J. Physiol. (1979), 293: 513 -523

Valenstein ES (2002) The discovery of chemical neurotransmitters. Brain and Cognition 49, 73-95.

Vega A (2013). Análisis de la segregación de transmisores clásicos y co-transmisores en neuronas simpáticas ante distintos factores ambientales. Tesis de Doctorado, Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM, 75.

Vega A, Cancino-Rodezno A, Valle-Lejía P, Sánchez Tafolla BM, Elinos D, Cifuentes F, Morales MA (2015). Neurotrophin-dependent plasticity of neurotransmitter segregation in the rat superior cervical ganglion in vivo. Devel Neurobio. 76 (8): 832-46.