



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**IMPACTO DEL ESTRÉS POR RESTRICCIÓN DE
MOVIMIENTO EN EL CONTENIDO DE
CATECOLAMINAS DE LA GLÁNDULA
SUPRARRENAL DEL RATÓN**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

DIANA MARÍA GARCÍA CHAVEZ



**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ELIA MARTHA PÉREZ ARMENDARIZ**

2015

Ciudad Univeritaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos de la alumna

García

Chávez

Diana María

29 76 03 84

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

307014410

2. Datos del tutor

Dra.

Elia Martha

Pérez

Armendariz

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Patricia Ileana

Joseph

Bravo

4. Datos del sinodal 2

Dra.

Limei

Zhang

Ji

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Leticia

Verdugo

Díaz

6. Datos del sinodal 4

Dr.

Rodrigo Erick

Escartín

Pérez

7. Datos del trabajo escrito

Impacto del estrés por restricción de movimiento en el contenido de catecolaminas de la glándula suprarrenal del ratón.

71 p.

2015

AGRADECIMIENTOS

Agradezco, especialmente, a mi tutora y Directora de tesis, la Dra. E. Martha Pérez Armendariz por acogerme en su laboratorio “Sinapsis Eléctricas” y asesorar este proyecto; por su atención, motivación y preocupación en la realización del mismo. Así mismo, agradezco enormemente al Dr. Benjamín Florán Garduño, Jefe del Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del Centro de Investigación y Estudios Avanzadas del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), por permitirme hacer uso de su laboratorio, equipo y reactivos para realizar las mediciones de mis muestras mediante la técnica de HPLC y por su apoyo académico.

Al Técnico Ricardo Vargas Orozco y MVZ Daniel Andrés Sánchez Almaraz del bioterio de la Unidad de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM en el Hospital General de México, por el suministro y apoyo técnico en la obtención de los ratones de la cepa C57BL/6, indispensable en la presente investigación.

Al Licenciado Javier Díaz por su apoyo bibliográfico.

Para montar el protocolo de estrés, extracción de muestras y su procesamiento así como medición de los niveles de catecolaminas conté con la ayuda de las siguientes personas a las que quiero agradecer enormemente:

Inicialmente, quiero agradecer enormemente al Dr. R. Erick Escartín Pérez, por enseñarme la técnica de HPLC y auxiliarme en la medición de mis muestras junto con el apoyo y supervisión de la M.C. Marina Rodríguez Sánchez.

También agradezco a la Dra. Ma. Cristina Paredes Carbajal de la Facultad de Medicina por su instrucción ante todo lo relacionado con el sistema circulatorio, conocimientos de utilidad para montar el protocolo de estrés.

Por otro lado, agradezco a la Dra. Leticia Verdugo Díaz del laboratorio de Bioelectromagnetismo del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la UNAM por instruirme acerca de todo lo relacionado con la generación de estrés, por permitirme trabajar en su laboratorio para medir la presión arterial de los ratones y usar el bioterio para alojar a los sujetos en estudio y generarles el protocolo de estrés por restricción

de movimiento. De este mismo laboratorio, quiero agradecer a la técnico del laboratorio Antonia, por su apoyo en el cuidado y mantenimiento de los ratones en el bioterio, así como su ayuda en el sacrificio y extracción de muestras de los ejemplares.

Agradezco especialmente a María de Lourdes Cruz Miguel del laboratorio de Sinapsis Eléctricas del departamento de Medicina Experimental por su apoyo, siempre incondicional, en el sacrificio de los ratones y en la obtención de muestras. De este mismo laboratorio, mi más sincero agradecimiento a la Dra. Cristina Coronel Cruz por su ayuda en la revisión y preparación de soluciones; pero sobre todo por su tiempo y paciencia al momento de procesar parte de las muestras para la determinación de catecolaminas y por realizar parte de las mediciones de proteínas por la técnica de Bradford.

También quiero agradecer al Dr. Sergio Zonszein y al Dr. Mario L. Calcagno del departamento de Bioquímica de la facultad de Medicina de la UNAM por enseñarme y ayudarme a utilizar la ultracentrífuga, paso indispensable en el procesamiento de las muestras.

Este proyecto se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) No. 127658 otorgado a la Dra. E. Martha Pérez Armendariz, del que fui beneficiada con una beca de pregrado (N° de becaria 20981). También agradezco al proyecto No. IN217812, “Efecto de la exposición a campos electromagnéticos sobre las respuestas conductuales y neuroendócrinas de ratas estresadas” del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por haberme apoyado con una beca para término de estudios de licenciatura.

ABREVIATURAS

A	Adrenalina	GDP	Guanosín difosfato
AC	Adenilato Ciclasa	GH	Hormona del crecimiento
ACh	Acetilcolina	Gi	Proteína G inhibidora
ACTH	Hormona adrenocorticotropa, corticotropina	GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
<i>ad libitum</i>	A voluntad	Gq	Proteína G que participa en el sistema de recambio de fosfoinosítidos-calcio
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico	gr/g	Gramos
AP-1,2	Proteína activadora 1 o 2	GRE	Elementos de respuesta a glucocorticoides
ATP	Adenosín trifosfato	Gs	Proteína G estimuladora
AVM	Ácido vanililmandélico	GTP	Guanosín trifosfato
AVP	Arginina-Vasopresina	HClO₄	Ácido perclórico
BLA	Amígdala Basolateral	HI	Hipoxia intermitente
°C	Grados Celsius	HPA	Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
CA	Catecolaminas	HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
Ca²⁺	Ión calcio	hr/hrs	Hora/ Horas
[Ca²⁺]_i	Concentración de calcio intracelular	HVA	Ácido homovanílico
CaMcinasa	Cinasa dependiente de calmodulina	IgG	Inmunoglobulina G
CCs	Células cromafines	IL-	Interleucina
CeA	Región amigdaloides central	IMO	Inmovilización
Cl⁻	Ión cloro	<i>In situ</i>	en el sitio
CLT	Control	IP₃	Inositol trifosfato
cm	Centímetros	K⁺	Ión potasio
CORT	Corticosterona	Kg	kilogramo
COMT	Catecol-O-metiltransferasa	KO	Ratones con knock out, con delección de algún gen
CRE	Elemento de respuesta a AMPc	L/l	litro
CRH	Hormona liberadora de corticotropina	LDL	Lipoproteínas de baja densidad
Cx	Conexina	LH	Hormona luteinizante
DA	Dopamina	L:O	Proporción de horas luz y oscuridad
DAG	Diacilglicerol	M	Molar
DBH	Dopamina β-hidroxilasa	MAO	Monoamino oxidasa
DHEA	Dehidropiandrosterona	MeA	Región amigdaloides medial
dl	Decilitros	mg	Miligramos
DNA	Ácido desoxirribonucleico	min	Minutos
DOPA	Dihidroxifenilalanina	ml	Mililitros
EGR-1	Proteína 1 de respuesta temprana al crecimiento	mM	Milimolar
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	Mn	Manganeso
<i>et al</i>	Y otros	mV	Mili volts
Fig.	Figura	µg	Microgramos
GABA	Ácido gamma-aminobutírico	µl	Microlitros
		µM	Micromolar
		N	Normal

N/n Tamaño de la muestra
NA Noradrenalina
Na⁺ Ión sodio
NADPH Nicotinamida adenina
dinucleótido fosfato
NaOH Hidróxido de sodio
ng Nanogramos
nm Nanómetros
nM Nanomolar
NOX NADPH-oxidasa
O₂ Oxígeno
OSA Ácido 1-octanesulfónico
PACAP Péptido activador de la adenilato
ciclase de la hipófisis
PACAP-1 Receptor de la PACAP
PBS Solución salina amortiguadora de
fosfatos
pg Picogramos
PIP₂ Fosfatidilinositol 4,5-difosfato
PKA Proteína cinasa A
PKC Proteína cinasa C
PLC Fosfolipasa C
PNMT N-metiltransferasa de
feniletanolamina
PVDF Polifluoruro de vinilideno
PVN Núcleo paraventricular
qRT-PCR PCR cuantitativo de tiempo real
RES Restricción
RNA^m Ácido ribonucleico mensajero
ROS Especies reactivas del oxígeno
rpm Revoluciones por minuto
SAM S-adenosil-metionina
SEM Error estándar de la media
SNARE Complejo de proteínas que
participa en la fusión de
vesículas
Sp1 Proteína específica 1
STR Ratones estrés
TH Tirosina hidroxilasa
THB Tetrahidrobiopterina
VMAT Transportador vesicular de
monoaminas
x g fuerza centrífuga
5-HT Serotonina

RESUMEN

La glándula suprarrenal es esencial para la respuesta del estrés al secretar catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y glucocorticoides. El estrés agudo es la adecuada respuesta al estrés, no obstante el crónico está asociado a diversas patologías, tales como la hipertensión, diabetes y cáncer.

En la presente tesis se evaluó si la restricción (RES) de movimiento por 2 horas diarias durante 5 días en ratones macho de la cepa C57BL/6 genera estrés crónico. Para esto, dos grupos de ratones (N=20) se mantuvieron en el bioterio durante una semana de adaptación y posteriormente por cinco días se expusieron por 2 horas a la RES de movimiento mediante su inserción en un tubo cilíndrico ventilado; se cuantificó la ingesta de líquidos y de comida, así como el peso, durante 12 días. Al término del periodo de RES, previo adormecimiento en un frasco con éter, los animales fueron sacrificados y las glándulas adrenales micro disecadas. Los niveles totales de las catecolaminas noradrenalina (NA) y adrenalina (A) de estas glándulas fueron determinados por el método de HPLC con detección electroquímica. RESULTADOS: Contrariamente a otros modelos de estrés por RES (pseudocrónico en ratones KO para 5HT_{2c} y crónico para ratones ICR), el peso y la ingesta de alimento durante la etapa experimental no cambia entre los grupos control y experimentales. No obstante, si se registró un aumento en la ingesta de líquidos durante el periodo experimental con respecto al de adaptación para los ratones expuestos a la RES en comparación a los controles. La RES de movimiento por 2 h diarias por una semana es suficiente para generar cambios en los niveles totales de CA. En particular se registró una disminución del 48.8% en el contenido de NA y 51.76% en el de A. Se concluye que el protocolo de estrés empleado es capaz de generar una respuesta al estrés que se ve reflejado en la disminución de CA. Lo anterior sugiere que aumenta la liberación de las CA en suero, estudios actuales están dirigidos a demostrar este aspecto; sin embargo, podría también tratarse de degradación.

CONTENIDO

Página

I. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1: LA GLÁNDULA ADRENAL

1

1.1 Anatomía

1

1.2. Glucocorticoides. Síntesis, productos hormonales y efectos generales

3

CAPÍTULO 2: CATECOLAMINAS (ADRENALINA Y NORADRENALINA)

5

2.1 Las células cromafines

6

2.2 Síntesis de catecolaminas

6

2.3 Metabolismo de catecolaminas

7

2.4 Estímulo-secreción de catecolaminas

8

2.4.1 Receptores a acetilcolina

8

2.4.1.1 Receptor nicotínico

8

2.4.1.2 Receptor muscarínico (IP₃)

9

2.4.2 Consecuencia distal de la activación del receptor a acetilcolina

11

2.4.3 Las uniones comunicantes (sinapsis eléctricas) como amplificadores de las señales inducidas por la ACh (sinapsis química)

12

CAPÍTULO 3: ACCIONES GENERALES DE LA ADRENALINA Y NORADRENALINA EN TEJIDOS PERIFÉRICOS

13

3.1 Receptores adrenérgicos

14

CAPÍTULO 4: ESTRÉS

16

4.1 Historia de generación del concepto de estrés

16

4.2 Epidemiología del estrés

17

4.2.1 Prevalencia de trastornos mentales relacionados con el estrés

17

4.3 Tipos de estrés

18

4.4 Respuesta del organismo al estrés

19

4.4.1 Estrés agudo

21

4.4.1.1 Cambios en la producción de catecolaminas en el estrés agudo

21

4.4.1.2 Mecanismos homeostáticos que regresan a las catecolaminas a su estado basal después de un estrés agudo

23

4.4.2 Estrés crónico

25

4.4.2.1 El estrés sostenido y las patologías crónicas

26

4.5 Mecanismos de regulación que incrementan las catecolaminas en el estrés

28

4.5.1 Efectos del cortisol en la PNMT

28

4.5.2 Cambios en las enzimas que sintetizan y metabolizan CA durante el estrés

29

4.6 Técnicas para medir CA

32

4.7 Modelos de estrés

33

4.7.1 Las CA durante el estrés fisiológico

34

4.7. 2 Las CA durante el estrés psicológico: Modelo de estrés por restricción	35
II. ANTECEDENTES	36
III. JUSTIFICACIÓN	39
IV. HIPÓTESIS	40
V. OBJETIVOS	40
VI. METODOLOGÍA	41
1. Modelo experimental utilizado en este estudio	41
2. Protocolo del modelo de estrés	41
2.1 Habitación al bioterio experimental	41
2.2 Exposición al estrés	41
2.3 Obtención de muestras	42
2.4 Procesamiento de las glándulas suprarrenales para HPLC	42
2.5 Determinación de proteínas totales (suprarrenales): Método de Bradford	43
2.6 Análisis de las muestras por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC)	44
2.7 Análisis estadístico	46
VII. RESULTADOS	47
1. Efectos del estrés por restricción de movimiento en la ingesta de agua, alimento y en el peso	47
1.1 Agua consumida	47
1.2 Alimento consumido	48
1.3 Peso	48
2. Análisis del contenido total de catecolaminas de la glándula adrenal de los ratones en estudio	49
VIII. DISCUSIÓN	51
1. Cambio en la ingesta de agua	51
2. Estrés en el peso y el consumo de alimento	51
3. Efecto del estrés por restricción en los niveles de adrenalina y noradrenalina en la glándula adrenal	53
IX. CONCLUSIONES	55
X. PERSPECTIVAS	56
XI. REFERENCIAS	57

I. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

LA GLÁNDULA ADRENAL

1.1 Anatomía

Las glándulas adrenales están situadas cada una sobre el polo superior de cada riñón y embebidas en tejido adiposo retroperitoneal. En el ser humano, la glándula adrenal derecha tiene forma piramidal y se localiza por debajo del hígado entre la vena cava inferior y el pilar anterior (un tendón de gran tamaño) del diafragma. La glándula adrenal izquierda tiene forma de media luna y se localiza medialmente al pilar izquierdo del diafragma; por detrás del páncreas y la arteria esplénica (Debuse, 2004).

Cada glándula adrenal o suprarrenal humana mide aproximadamente 4 cm de longitud y 3 cm de grosor y en conjunto pesan de 8 a 10 g. La irrigación arterial se deriva de 3 fuentes: la arterial suprarrenal superior (a partir de la arteria frénica inferior), la arteria suprarrenal media (directamente de la aorta abdominal) y la arterial suprarrenal inferior (a partir de la arteria renal). Por su parte, el drenaje venoso se realiza por una única vena adrenal de cada lado; la vena adrenal derecha drena sangre a la vena cava inferior y la izquierda a la vena renal izquierda que a su vez desemboca en la vena cava inferior (Fig. 1). La glándula suprarrenal está constituida por dos regiones: la médula y la corteza (ocupa el 80% del volumen total de cada glándula). Por un lado, la médula recibe sangre enriquecida de productos secretados por la corteza pero pobre en oxígeno, y por otro lado, recibe sangre oxigenada y rica en nutrientes provenientes de la irrigación arterial directa (Kacsoh, 2000).

La glándula suprarrenal está inervada por las fibras simpáticas preganglionares que descienden desde el nervio esplácnico mayor, ramo de la porción torácica del tronco simpático, que se originan en la médula espinal y por el nervio frénico, formando un plexo nervioso (Fig. 2). Las fibras nerviosas terminan en las células cromafines de la médula suprarrenal, que son comparables con neuronas posganglionares. Sin embargo, como vemos en la figura 7A, no todas las células cromafines se encuentran inervadas; debido a esto las uniones comunicantes son importantes para la secreción (se describe

posteriormente). La acetilcolina es el neurotransmisor liberado entre las terminaciones nerviosas y las células secretoras de adrenalina y noradrenalina. Por su parte la corteza tiene una innervación mucho menor. Su actividad secretora está regulada principalmente por la adrenocorticotropina (ACTH) liberada de la hipófisis y por el sistema renina-angiotensina (Kacsoh, 2000).

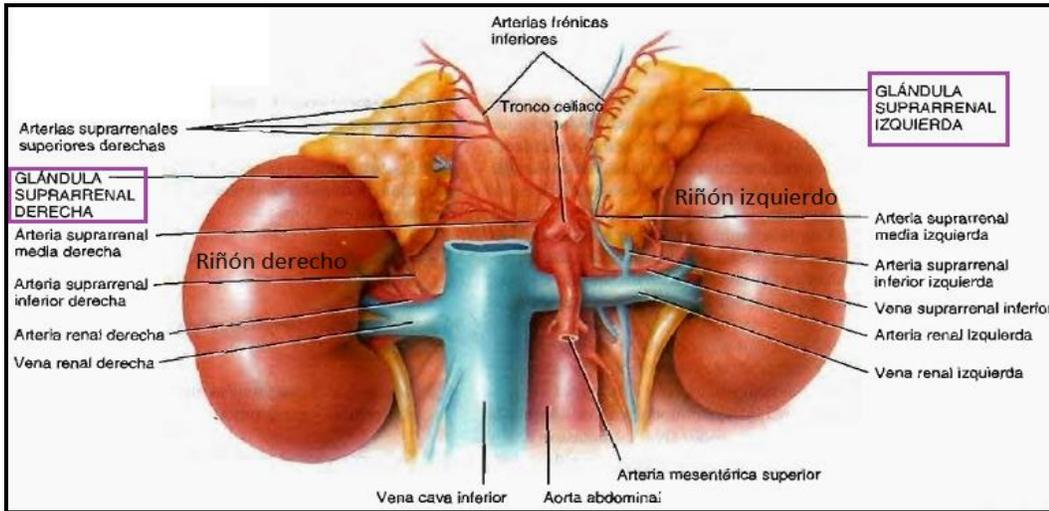


Figura 1: Arreglo anatómico e irrigación sanguínea de las glándulas adrenales. Imagen tomada y modificada de Tortora y Derrickson, 2006.

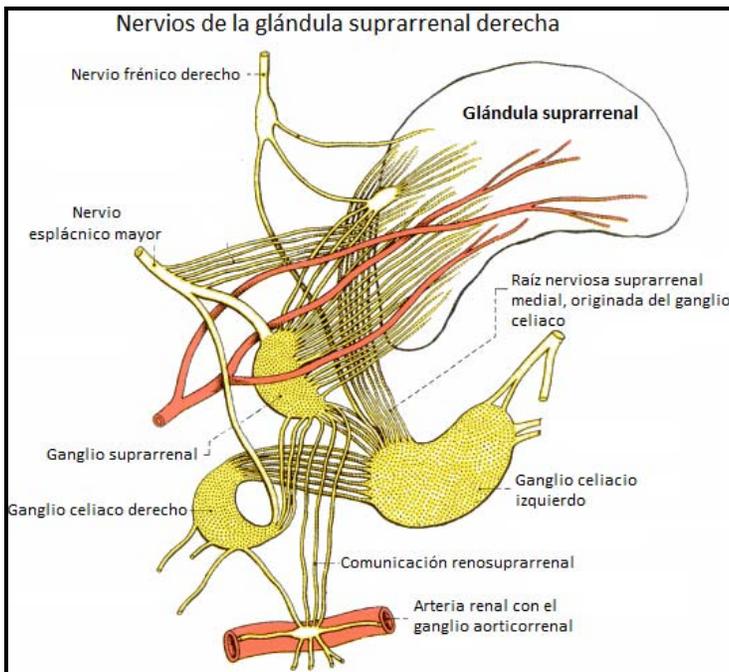


Figura 2: Innervación de la glándula suprarrenal derecha. Imagen tomada y modificada de Ruiz, A. 2008.

1.2 Glucocorticoides. Síntesis, productos hormonales y efectos generales

En la zona fasciculada (50 % de la masa de la glándula) de la corteza suprarrenal (Figura 3) las células contienen grandes cantidades de retículo endoplásmico liso y mitocondrias que participa en la formación de los glucocorticoides (Ganong, 2004).

Los glucocorticoides derivan del colesterol. Aunque las células de la corteza pueden sintetizar *de novo* pequeñas cantidades de colesterol a partir de acetato, casi el 80% del colesterol empleado proviene de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) del plasma. Cuando el colesterol entra en la célula, pasa a las mitocondrias en donde actúa la enzima colesterol desmolasa para formar pregnenolona, molécula precursora de todos los esteroides suprarrenales (Guyton y Hall, 1997). Esta enzima es modulada por la ACTH, que estimula la síntesis de esteroides suprarrenales. La ACTH además aumenta el número de receptores de LDL de las células corticosuprarrenal. Los principales glucocorticoides producidos son el cortisol y la corticosterona (CORT), el primero actúa más en humanos y el segundo en ratas y ratones (Guyton y Hall, 1997).

La síntesis y secreción de glucocorticoides inicia con la activación del eje neuroendocrino HPA. En este eje, el núcleo paraventricular (PVN) en el hipotálamo libera CRH (hormona liberadora de corticotropina). La CRH actúa en las células corticotropas de la adenohipófisis estimulando la síntesis de la proopiomelanocortina (POMC), la pro-hormona precursora de ACTH, hormona estimulante de los melanocitos y de β -endorfinas (Dorantes *et al*, 2012). En la adenohipófisis la CRH promueve la liberación de ACTH que se une con receptores de gran afinidad en la membrana de las células de la capa fascicular, productora de glucocorticoides, de la corteza suprarrenal activando la AC (adenilato ciclasa) mediante proteínas G_s . Esto provoca un aumento en el AMPc (adenosín monofosfato cíclico) y la consecuente activación de la PKA (proteína cinasa A) (Se explica posteriormente) (Ganong, 2004).

Las hormonas hipotalámicas llegan a la adenohipófisis a través del sistema porta hipofisario, en este sistema la sangre fluye desde los capilares del hipotálamo a las venas portales que llevan la sangre a los capilares del lóbulo anterior de la hipófisis (Tortora y Derrickson, 2006).

En humanos, la concentración sanguínea del cortisol (matutina y en ayuno) es de 12 µg/dL y la tasa secretora, de 10-20 mg/día (Ganong, 2004). Aproximadamente del 90 al 95% del cortisol plasmático se une a las proteínas del plasma (transcortinas y albúminas), proceso que permite una vida media larga, de 60 a 90 minutos. Los esteroides suprarrenales se descomponen sobre todo en el hígado y se conjugan para formar ácido glucurónico y en menor medida sulfatos. Estos conjugados se eliminan por la bilis y se excretan por la orina (Guyton y Hall, 1997).

El cortisol ejerce sus efectos mediante interacción inicial con los receptores intracelulares de las células blanco. El complejo hormona-receptor interactúa con secuencias reguladoras específicas del ADN (ácido desoxirribonucleico), denominadas elementos de respuesta a los glucocorticoides (GRE), que inducen o reprimen la transcripción génica de proteínas mediadoras de numerosos efectos fisiológicos (Guyton y Hall, 1997).

En general, los glucocorticoides participan en el metabolismo de carbohidratos, proteínas y grasas. Con relación al metabolismo de carbohidratos, estimulan la gluconeogénesis en el hígado (aumentan la glucemia), disminuyen la captura de la glucosa por la mayoría de las células del cuerpo. Con respecto a las proteínas, reducen los depósitos de proteínas celulares, menos en el hígado y en el plasma en donde las incrementa, de esta forma aumentan los aminoácidos sanguíneos, disminuye el transporte de aminoácidos a las células extra hepáticas pero lo incrementa hacia los hepatocitos. Finalmente el cortisol participa en la movilización de los ácidos grasos y los incrementa en el plasma (Guyton y Hall, 1997).

Cuando los niveles de cortisol se encuentran incrementados, poseen efectos antiinflamatorios; además se bloquea la respuesta inflamatoria a las reacciones alérgicas. En el sistema inmune ocasiona una reducción en el número de eosinófilos y de linfocitos de la sangre (Guyton y Hall, 1997).

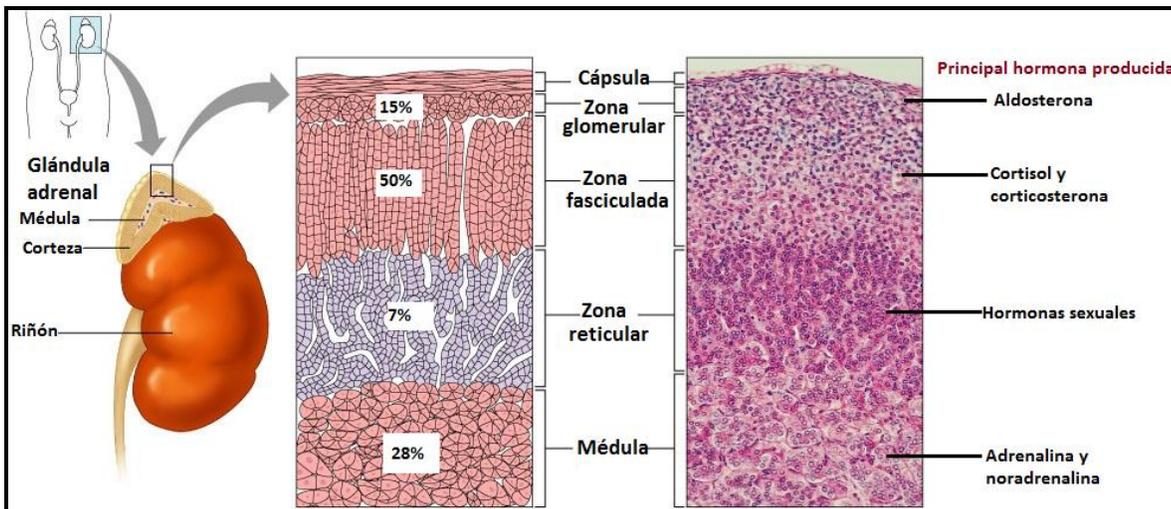


Figura 3. Esquemas y corte histológico de las distintas zonas de la glándula suprarrenal. En porcentajes se indican la proporción de masa ocupada por cada una y a la derecha se indican brevemente las hormonas secretadas por cada zona. (Imágenes tomadas y modificadas de *Google imágenes*)

CAPÍTULO 2

CATECOLAMINAS (ADRENALINA Y NORADRENALINA)

Se conocen como catecolaminas aquellos derivados del catecol (anillo bencénico con dos grupos hidroxilo adyacentes en la posición 3 y 4) con una cadena lateral que lleva un grupo amino. En condiciones fisiológicas existen tres compuestos de catecolamina (CA), estos son la dopamina (DA), noradrenalina (NA) y adrenalina (A) (Figura 4). Estas moléculas son altamente polares e hidrofílicas. En el organismo actúan como hormonas o neurotransmisores, tanto en el sistema nervioso central como en el periférico y están involucrados en múltiples sistemas regulatorios y procesos metabólicos (Bicker *et al*, 2013).

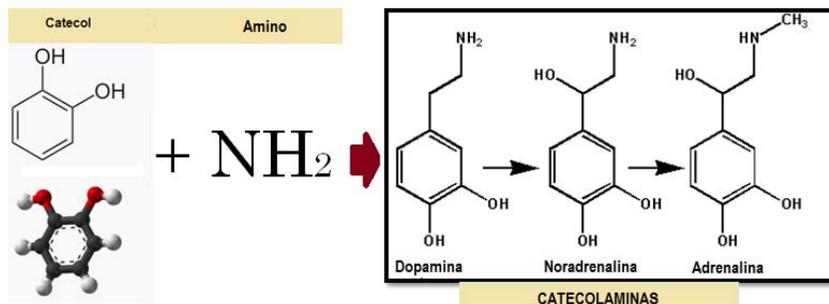


Figura 4: Estructura de las catecolaminas.

2.1 Las células cromafines

Las catecolaminas de la médula adrenal se sintetizan y secretan de células conocidas como cromafines o feocromocitos. Estas células reciben su nombre debido a que se tiñen de café con dicromato de potasio, el cual oxida las catecolaminas en melanina polimerizada. Las células cromafines (CCs) tiene dos subpoblaciones: las que producen NA contienen gránulos secretores pequeños y densos; por otro lado, las productoras de A son más numerosas y sus gránulos secretores son de mayor tamaño, contenido más homogéneo y menos denso. Estos tipos celulares representan distintos estados fisiológicos dentro de una misma población y dependiendo de la exposición a diferentes concentraciones de cortisol pueden cambiar su fenotipo (Kacsoh, 2000). Sin embargo, experimentalmente se ha encontrado que la proporción de células noradrenérgicas a adrenérgicas es de 1:5 a 1:10 (~25% NA/ ~75% A) en cultivos primarios de células cromafines bovinas (Núñez *et al*, 1995).

2.2 Síntesis de catecolaminas

El precursor de las CA es el aminoácido tirosina. La DA es el resultado de la hidroxilación de la tirosina por la tirosina hidroxilasa (TH) y su posterior descarboxilación. La actividad de la TH es regulada por la actividad simpática y los niveles intracelulares de las CA (retroalimentación negativa) (Kacsoh, 2000).

La NA se forma por la hidroxilación de la DA gracias a la dopamina β -hidroxilasa (DBH) la cual contiene cobre y emplea a la vitamina C como cofactor. Esta reacción se lleva a cabo en las vesículas secretoras ubicadas dentro de la célula cromafin. Finalmente, la A se forma por metilación de la NA.

La enzima que cataliza la formación de adrenalina es la N-metiltransferasa de feniletanolamina (PNMT). Esta enzima usa S-adenosil-metionina (SAM) como donador del grupo metilo. Esta reacción de metilación se lleva a cabo en el citoplasma, por lo que la NA sale del gránulo secretor; lo cual implica que la A sintetizada debe retornar a la vesícula por medio de un transporte activo a través del transportador vesicular de monoaminas (VMAT) (Fig. 5). La expresión de PNMT en la médula adrenal depende la concentración local de cortisol el cual llega a través de la irrigación arterial. La adrenalina funciona como un inhibidor de la PNMT (retroalimentación negativa) (Kacsoh, 2000).

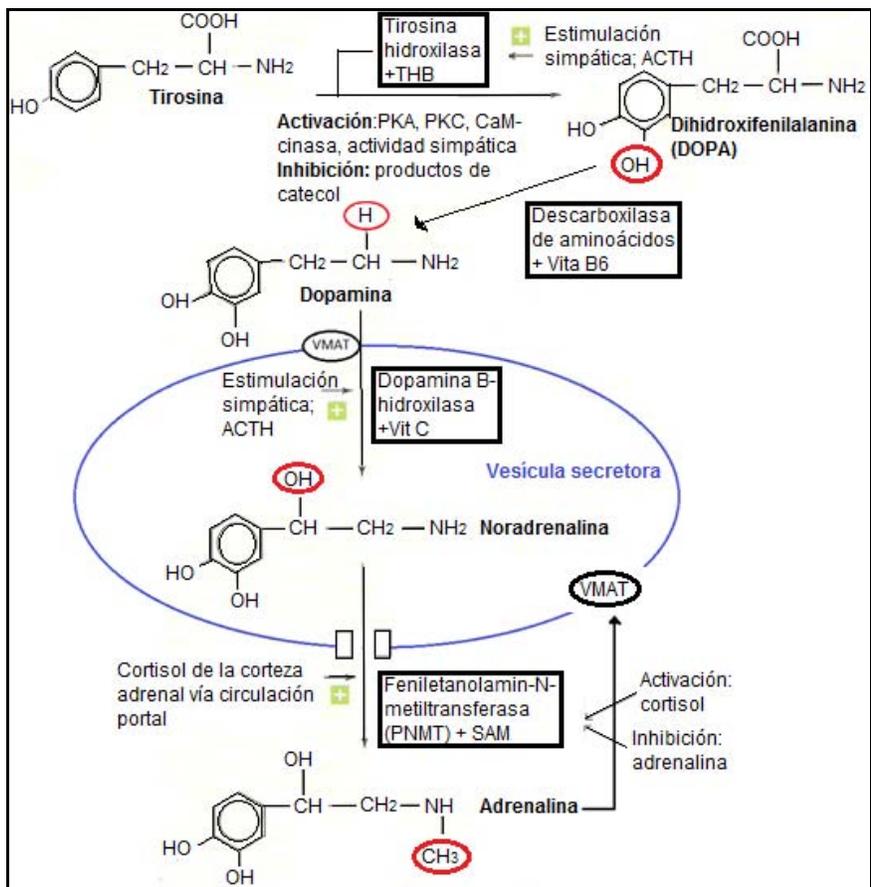


Figura 5: Ruta biosintética de las catecolaminas. La mayoría de las reacciones ocurren en el citoplasma, excepto la conversión de DA en NA en las vesículas secretoras. Los cofactores usados por las enzimas incluyen: tetrahidrobiopterina (THB), S-adenosil-metionina (SAM), Vitaminas B6 y C. Los reguladores principales de la vía se muestran a la derecha (Tomado de Boron y Boulpaep, 2009 y complementado de Kacsoh, 2000).

2.3 Metabolismo de catecolaminas

Las CA provenientes de la médula adrenal tienen una vida media de 2 minutos en la circulación. En el plasma, cerca del 95% de la DA y 70% de la NA y A forman conjugados sulfatados inactivos. En una persona en decúbito (acostada) la concentración plasmática normal de NA es de 300 pg/ml, la de A es de 30 pg/ml y la de dopamina de 35 pg/ml (Ganong, 2004). Las enzimas responsables de su degradación son la monoamino oxidasa (MAO) y la catecol-O-metiltransferasa (COMT). La primera se localiza en el sistema nervioso central y en tejidos periféricos, donde ocasiona una desaminación oxidativa, la cual produce aldehídos que posteriormente son transformados a ácidos carboxílicos o alcoholes y actúa principalmente en el hígado. La COMT es principalmente extra-neuronal y actúa mediante una 3-O-metilación en el hígado y el riñón. Además, los grupos hidroxilo fenólicos de las CA pueden conjugarse como sulfatos o glucurónidos (Kvetňanský *et al*, 2013).

El metabolito final de la DA es el ácido homovanílico (HVA) y es excretado por la orina. En el caso de la A y NA se produce el ácido vanililmandélico (AVM) que también se excreta por la orina (Fig. 6). Existe un amplio rango de concentración de CA y sus metabolitos en el plasma sanguíneo, que depende del balance entre la síntesis y metabolismo de estas moléculas, además de su vida media (Bicker *et al*, 2013).

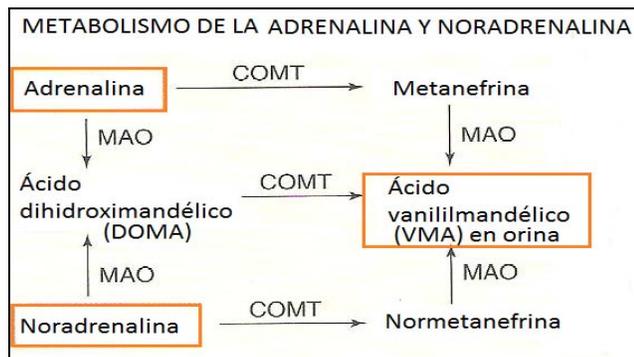


Figura 6: Degradación de catecolaminas. Tomado y modificado de Boron y Boulpaep, 2009.

2.4 Estímulo-secreción de catecolaminas

2.4.1 Receptores a acetilcolina

Las CCs son estimuladas principalmente por la ACh a través del nervio esplácnico. Este neurotransmisor actúa tanto en receptores nicotínicos como muscarínicos.

2.4.1.1 Receptor nicotínico

El receptor nicotínico es ionotrópico, esto es, contiene un canal catiónico por lo que su activación resulta en el incremento de la permeabilidad de las células al Na^+ y al Ca^{2+} .

Los canales de Na^+ , dependientes del voltaje (Na^+-V), contribuyen a despolarizar la membrana para que se abran los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Las células cromafines de mamíferos expresan todos los tipos de canales de calcio (L, N, P/Q, R y T). Estos canales permiten el influjo de calcio requerido para aumentar la concentración intracelular de este ión $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo cual es necesario para la exocitosis de los gránulos que contienen a las catecolaminas (Fig. 9) (Pérez-Álvarez y Albillos, 2007).

Los canales L y N, P/Q y R son de alto umbral (-30 mV). Los L tienen una inactivación lenta que permite el mayor influjo de Ca^{2+} . El incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ activa a la cinasa

dependiente de calmodulina (CaM cinasa). La CaM cinasa está involucrada en acelerar la movilización de vesículas y mantener una reserva de vesículas disponibles para liberarse (pool secretor) (Ver adelante) (Kuri, 2010). Por su parte, los de canales de K^+ dependientes del voltaje (Kb) y los de K^+ dependientes de Ca^{2+} , regresan el potencial de membrana a su valor de reposo (Baker y Knight, 1985). Los canales tipo T son de bajo umbral (-60 mV) y se ha propuesto que regulan la excitabilidad en las CCs fetales y neonatales hasta que estas son inervadas durante la primera semana de nacimiento. También que su expresión aumenta con el estrés del nacimiento (Ver más adelante) (Kuri, 2010). Los canales tipo N, P/Q y R, se inhiben por el ATP y los opioides liberados conjuntamente con las CA por los gránulos de la propia célula cromafin durante la actividad celular.

2.4.1.2 Receptor muscarínico (IP_3)

El termino *muscarínico* se refiere a los efectos de la muscarina, sustancia proveniente de un hongo (*Amanita muscaria*), que tiene efectos similares a los de la nicotina, contenida en el tabaco, y de la ACh (Perlman y Role, 1985).

La activación del receptor muscarínico produce una exocitosis más retardada después de una estimulación prolongada de ACh en las CCs. Los receptores muscarínicos están acoplados a proteínas G_q .

Los receptores acoplados a proteínas G son conocidos como receptores serpentina o heptahelicales caracterizados por cruzar la membrana 7 veces. Están acoplados a proteínas G heterotriméricas, formadas por 3 subunidades designadas α , β y γ . La sustitución de un GDP por un GTP en la subunidad alfa la activa y la separa del complejo, lo que le permite unirse a una proteína efectora iniciado así la cascada de señalización (Ganong, 2004).

Existen 5 tipos de proteínas G. Las principales son G_s , G_q y G_i , que pueden activar o inhibir segundos mensajeros intracelulares. Las proteínas G_s estimulan a la adenilato ciclasa (AC) una proteína transmembranal que cataliza la conversión de ATP en AMPc. Por el contrario las proteínas G_i la inhiben. El AMPc es un segundo mensajero que activa a la PKA

la cual fosforila proteínas en sus residuos de serina y treonina y produce así efectos fisiológicos (Fig. 7).

Las proteínas G_q activan otro sistema, el sistema de recambio de fosfoinosítidos calcio. En esta vía, la activación del receptor induce la escisión del fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) por actividad de la fosfolipasa C (PLC), produciéndose diacilglicerol (DAG) e inositol 1, 4, 5-trifosfato (IP₃). Al momento de la escisión del PIP₂, el DAG se queda anclado a la membrana. Por otra parte el IP₃, molécula soluble, difunde rápidamente por el citoplasma y llega al retículo endoplásmico (RE) en donde se une a los receptores de IP₃, lo que ocasiona la liberación de los almacenes de Ca^{2+} (La concentración de Ca^{2+} en el RE es de aproximadamente 1 mM). El Ca^{2+} se libera rápidamente siguiendo su gradiente de concentración y aumenta su concentración intracelular de su valor de reposo (cuya concentración es de aproximadamente de 10 a 150 nM) hasta valores que pueden aumentar hasta > 100 veces (Alberts *et al*, 2008; Pérez-Álvarez y Albillos, 2007; Perlman y Role, 1985). Posteriormente, el Ca^{2+} se une al DAG en la membrana para activar a la proteína cinasa C (PKC). La PKC fosforila proteínas en residuos de serina y treonina y produce efectos fisiológicos diversos (Fig. 8) (Ganong, 2004).

Hay estudios que sugieren que la activación de PKC está involucrada con el reclutamiento de gránulos de catecolaminas del pool fácilmente liberable, lo que resulta en una mayor respuesta bajo estimulación (Kuri, 2010).

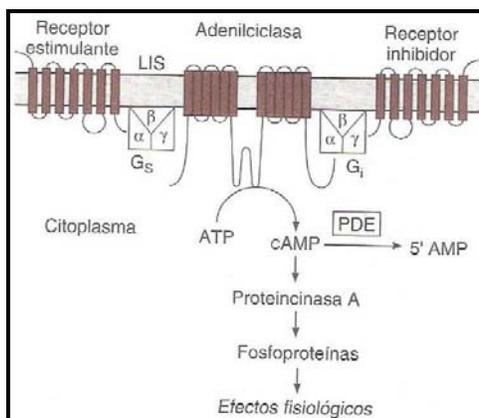


Figura 7: Activación del sistema del AMPc. Función de proteínas G_i y G_q . Tomado de Ganong, 2004.

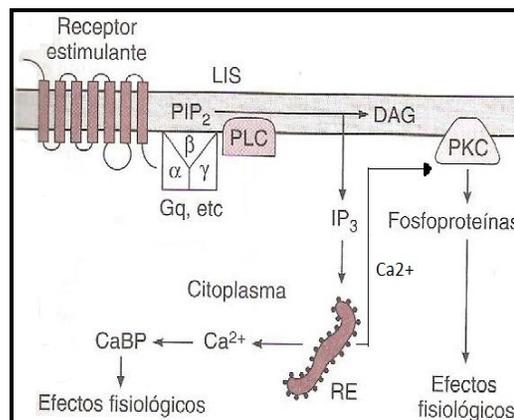


Figura 8: Activación del sistema de recambio de fosfoinosítidos/ calcio. Tomado de Ganong, 2004.

2.4.2 Consecuencia distal de la activación del receptor a acetilcolina.

La activación de los receptores a ACh produce un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$. La syntaxina y sinaptotagmina, son proteínas activadas por el Ca^{2+} y están asociadas con el complejo SNARE e involucradas en el acoplamiento y fusión de las vesículas. Se ha sugerido que la sinaptotagmina es el sensor de Ca^{2+} que provoca la liberación de las vesículas con catecolaminas cuando se llega a una concentración crítica. Después de la exocitosis, la membrana de las vesículas es recuperada y reciclada para la formación de nuevas vesículas (Kuri, 2010).

El 80% de las CA liberadas es A; sin embargo el radio molar entre NA: A es de 9:1 lo cual implica que la mayor parte de la NA circulante se deriva de fuentes extra-adrenales (Kacsoh, 2000).

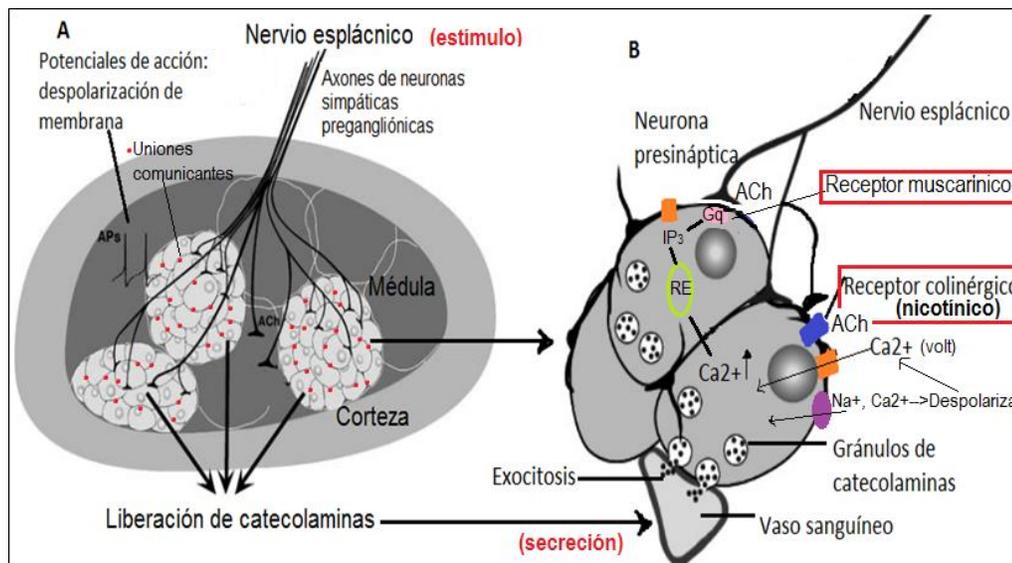


Figura 9: Estimulación de la médula adrenal para la secreción. **A:** Glándula adrenal y clusters de células cromafines en donde se muestran potenciales de acción que se propagan por las uniones comunicantes para la secreción, **B:** Ampliación de un agregado de células cromafines. Actuación de la acetilcolina en receptores muscarínicos, a través de la señalización por IP_3 , y nicotínicos, mediante la apertura de canales de cationes que despolarizan la membrana y alcanzan el umbral para los canales de Na^+ y Ca^{2+} dependientes del voltaje ocasionando un aumento en la concentración de calcio intracelular que resulta en la exocitosis de los gránulos que contienen las catecolaminas. Tomado y modificado de Colomer *et al*, 2009 y Guérineau, 2012.

Además de las CA, las CCs sintetizan, almacenan y liberan de los gránulos otros mensajeros químicos y moléculas como el ATP, la cromogranina A (función general en el almacenamiento y la secreción), el neuropéptido Y, péptidos opioides (pro encefalina) y GABA (Ganong, 2004).

2.4.3 Las uniones comunicantes (sinapsis eléctricas) como amplificadores de las señales inducidas por la ACh (sinapsis química).

Las CCs se encuentran como agregados en la médula suprarrenal. En estos agregados de CCs están intercomunicadas directamente a través de canales intercelulares. Las uniones comunicantes o sinapsis eléctricas son conglomerados de canales intercelulares formados por la aposición de dos hemicanales, cada uno aportado por una célula del par, que permiten el movimiento directo de iones y segundos mensajeros entre células adyacentes (Nicholson, 2003). Cada hemicanal está compuesto por seis subunidades proteicas llamadas conexinas (Cx), en vertebrados. Los canales intercelulares conectan el citoplasma de dos células contiguas y por lo tanto provee una ruta directa para la señalización eléctrica y metabólica entre células acopladas (Guérineau, 2012).

Como ya se mencionó, no todas las CCs están inervadas. Cuando se activa el receptor de ACh, por la actividad del nervio frénico, la despolarización de la célula cromafin se produce un potencial de acción el cual puede propagarse a las CCs vecinas a través de los canales intercelulares o de uniones comunicantes generando un acople eléctrico que amplificará la señal entre células adyacentes (Guérineau, 2012).

CAPÍTULO 3

ACCIONES GENERALES DE LA ADRENALINA Y NORADRENALINA EN TEJIDOS PERIFÉRICOS

Las CA tienen efectos en múltiples células diana del cuerpo. La tabla 2 resume sus principales acciones fisiológicas y los receptores por medio de los cuales actúan. Sus acciones críticas para las reacciones de estrés las llevan a cabo principalmente en el sistema circulatorio, en el hígado, músculo y tejido adiposo.

Efectos en el corazón y sistema circulatorio

La NA y A aumentan la fuerza y frecuencia de contracción del corazón aislado (participación de receptores β_1) e incrementan la excitabilidad miocárdica. Específicamente, la NA produce vasoconstricción en la mayoría de los órganos mediante los receptores α_1 y ocasiona una elevación de la presión sanguínea sistólica y diastólica. También origina un aumento en la presión del pulso (Ganong, 2004).

Efectos en el hígado y músculo esquelético

Tanto la A como la NA poseen una gran variedad de efectos metabólicos que incluyen la glucogenólisis en el hígado y en el músculo movilización de ácidos grasos libres, aumento en el lactato plasmático y estimulación de la tasa metabólica.

La A dilata los vasos sanguíneos en el músculo esquelético y el hígado mediante los receptores β_2 (Kacsoh, 2000).

Efectos en el tejido adiposo

Los adipocitos expresan receptores β_3 adrenérgicos. Debido a que la NA posee una mayor afinidad por estos receptores, esta CA es la principal reguladora de la lipólisis.

Efectos en otros tejidos.

Con la activación del sistema simpato-adrenal también se produce la broncodilatación y hay un aumento en la irrigación a los pulmones por lo que se incrementa la ventilación; procesos críticos para las respuestas al estrés. Así mismo, se desvía sangre de la región esplácnica y

la piel al músculo mientras se retiene la perfusión de sangre en el cerebro. En general, aumenta el estado de alerta e incluso la A casi siempre induce ansiedad y miedo y puede desencadenar en otros problemas como insomnio. Así mismo, ambas hormonas aumentan la secreción de insulina y glucagón a través de receptores β pero las inhiben por medio de receptores α_2 (Kacsoh, 2000).

3.1 Receptores adrenérgicos

Pertencen al tipo de receptores acoplados a proteínas G (explicados anteriormente) Las que se unen a receptores adrenérgicos son la G_s , G_i y G_q .

Los efectos de las CA se dan por acción de dos tipos de receptores, los adrenérgicos α y β . Los receptores α se subdividen en dos tipos, α_1 y α_2 , y los receptores β en β_1 , β_2 y β_3 (Fig. 10). Por lo general, la NA tiene mayor afinidad por los receptores α y la A por los β ; pero a su vez, la NA tiene mayor afinidad por los receptores β_3 adrenérgicos (Tabla 1) (Kacsoh, 2000).

Tipo de receptor	Tipo de proteína G en la que actúa	Afinidad por el receptor
α_1	Gq	A \approx NA
α_2	Gi	A \approx NA
β_1	Gs	A \approx NA
β_2	Gs	A \gg NA
β_3	Gs	A \ll NA

Tabla 1: Afinidad de la adrenalina (A) y noradrenalina (NA) por el tipo de receptor adrenérgico. Modificado de Kacsoh, 2000.

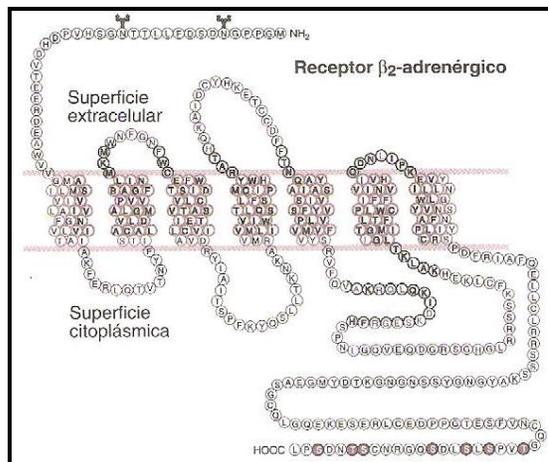


Figura 10: Estructura del receptor β_2 adrenérgico. Se pueden observar los 7 pasajes transmembranales. La región amino terminal es extracelular y la carboxilo terminal citoplásmica. Tomado de Ganong, 2004.

Tabla 2: Órganos blanco y efectos fisiológicos de las catecolaminas.

Órgano efector		Activación simpatoadrenal mediada por la adrenalina y noradrenalina	
Categoría	Blanco	Receptor	Respuesta
Corazón	Nodo sinoatrial	β_1	Taquicardia
	Ventrículos		Incrementa contractilidad y velocidad de conducción
Arteriolas	Coronarias	α_1	Vasoconstricción (aisladas), vasodilatación (in situ)
	Músculo esquelético		
		β_2	Vasodilatación
	Cerebro	α_1	Vasoconstricción débil
	Área esplácnica		Vasoconstricción
Piel y mucosa			
Venas		α_1	Vasoconstricción (incrementa retorno sanguíneo)
Pulmones	Músculo bronquial	β_2	Broncodilatación
Metabolismo	Músculo	β_2	Glucogenólisis
	Hígado	β_2 (α_1)	
	Adipocitos	β_3	Lipólisis
Islote pancreático	Secreción de insulina	α_2	Inhibición
		β_2	Estimulación
	Secreción de glucagon	β_2	Estimulación
Gastrointestinal	Motilidad	α_1, α_2	Disminuye
	Secreción de jugos digestivos	α_2	Inhibición
Glándulas salivares		β_1	Estimulación en la secreción de moco
Piel	Glándulas sudoríparas	α_1	Sudoración
Ojo	Músculo de la pupila	α_1	Dilatación de la pupila
Órgano reproductor masculino		α_1	Eyaculación
Útero		β_2	Relajación
		α_1	Contracción en embarazadas

Tomado y modificado de Kacsoh, 2000.

CAPÍTULO 4

ESTRÉS

4.1 Historia de generación del concepto de estrés.

El concepto de estrés ha sido ampliamente discutido y continúa siéndolo. Claude Bernard y Walter B. Cannon en 1865 y 1932 respectivamente, propusieron el concepto de medio interno y homeostasis, ideas que posteriormente se integrarán al concepto de estrés.

El término “estrés” fue empleado inicialmente por Hans Selye en 1950 que lo define como “la respuesta no específica del cuerpo a cualquier demanda que se le haga” (Selye y Heuser, 1956). En años posteriores, varios autores definieron al estrés como “cualquier amenaza o alteración de la homeostasis”. Weiner en 1991 menciona que el concepto de estrés fluye de forma natural a partir de la teoría de la Selección Natural de Darwin (1859), y lo define como “la presión selectiva que deriva del ambiente físico y social y que puede ser concebido como una amenaza o desafío a la integridad y sobrevivencia del organismo”. Esta definición nos refiere más a considerar que la respuesta al estrés, de los seres vivos, será para adaptarse al ambiente cambiante.

Por su parte, Sapolsky (2002) lo define como cualquier cosa que altere el balance fisiológico del organismo. Mientras que Koolhaas y colaboradores (2011) proponen que el término de estrés debe ser aplicado a estímulos incontrolables e impredecibles por lo que definen a un estresor como un estímulo o condición ambiental en donde las demandas de respuesta sobrepasan, a ese tiempo, la capacidad de adaptación del organismo.

De lo anterior se puede sintetizar la definición de estrés como “la respuesta ante una serie de estímulos denominados estresores provocados por cambios ambientales que se traducen en una alteración a la homeostasis. Esta alteración provocará una respuesta psicológica, fisiológica y de comportamiento la cual permitirá mejorar las posibilidades de hacer frente a la amenaza (fuente de estrés) para mitigarla, evadirla o eliminarla al adaptarse y así garantizar la sobrevivencia.

4.2 Epidemiología del estrés

El estrés está relacionado con numerosos padecimientos crónicos que son responsables de más del 60% de las muertes en el mundo, así como con el desarrollo de algunos trastornos mentales como la depresión y los trastornos de ansiedad (Berenzon *et al*, 2012).

4.2.1 Prevalencia de trastornos mentales relacionados con el estrés

Trastorno de ansiedad

En el 2003, México presentó una prevalencia de trastornos de ansiedad de 6.8%, según el estudio de la Encuesta Mundial de Salud Mental de la OMS, en comparación con los niveles más altos, pertenecientes a EUA, Francia y Líbano con 18.2%, 12% y 11.2%, respectivamente (Olivier y Hernández, compiladores, 2012). En contraste, según el estudio de la Encuesta Nacional de Epidemiología Psiquiátrica, presentó una prevalencia de 18.5% en mujeres y 9.5% en hombres. Además, el estudio nacional mostró que se presenta más en personas de entre 40-50 años y en menor grado en la población mayor de 60 años (Boletín de Información Clínica Terapéutica de la Academia Nacional de Medicina, 2012).

Depresión

La OMS reporta que en el 2001, la prevalencia de depresión en el mundo fue de 5.8% en los hombres y 9.5% en mujeres. Más aún, estima que en los próximos 20 años la depresión será la segunda causa de años de vida saludable perdidos a escala mundial y la primera en países desarrollados.

En México, existen 3 picos depresivos en la población, el primero a los 17 años, el segundo a los 33 y el tercero después de los 60 años siendo igualmente mayor en todos los casos para las mujeres con un 4.0% (vs 1.6%) 7.9% (vs 2.7%) y 9.5% (vs 5%), respectivamente (Olivier y Hernández, compiladores, 2012).

Estrés postraumático

En un estudio realizado en zonas urbanas de México, se entrevistó a 5826 individuos, preguntándoles sobre la exposición a diferentes sucesos violentos vinculados al estrés postraumático. Se encontró que la prevalencia del trastorno fue de 2.3% en las mujeres y 0.49% en los hombres y las principales causas de éste fueron: la persecución o acoso, la violación, el secuestro, el abuso sexual y la violencia intrafamiliar (Medina, M. *et al*, 2005).

4.3 Tipos de estrés

De acuerdo a la duración del evento estresante, el estrés puede clasificarse como **agudo** o **crónico**. En general, se considera que el estrés es agudo cuando el estímulo sólo se aplica una vez o un día; cuando involucra experimentos en un periodo de tiempo entre 3 y 5 días se determina pseudocrónico y cuando es más de 5 días se refiere en la literatura como crónico (Jöels y Baram, 2009).

Asimismo el estrés se puede dividir en psicológico y físico. El **estrés psicológico** incluye la respuesta emocional o de percepción a un estímulo. Este tipo de estrés está motivado por la programación innata específica y experiencias previas e involucra la participación de las regiones responsables de las emociones (amígdala y corteza pre frontal), el aprendizaje y la memoria (hipocampo), así como la toma de decisiones (corteza pre frontal), que directa o indirectamente convergen al PVN y activan el sistema nervioso simpático o el eje HPA (Ver Fig.11 y 12) (Jankord y Herman, 2008). Esto se conoce como la vía límbica-PVN en la cual se da la activación de la señalización por los circuitos de la amígdala y la corteza infra límbica e inhibición por señalización neuronal de la corteza pre límbica y el hipocampo (Herman, 2012). En condiciones silvestres los animales experimentan este tipo de estrés como cambios en el orden social, separación de las crías de la madre, competencia por los recursos, o bien por condiciones de RES e IMO que son acompañados de angustia y miedo (Jöels y Baram, 2009).

En el caso del **estrés físico**, se involucran circuitos neuronales que usualmente descifran el estímulo a nivel de tronco cerebral y están dados por los órganos circunventriculares, los cuales envían proyecciones al PVN para que se produzca CRH y la subsecuente secreción de glucocorticoides (Ver Fig. 11 y 12) (Jankord y Herman, 2008; Herman, 2012). Para el estrés físico, en donde ya se involucra un daño directo a los tejidos, existen protocolos en donde se limita la ingesta de agua y alimento, la manipulación del individuo, aplicación de choques eléctricos, condiciones de hipoxia, temperaturas inadecuadas, ruidos fuertes, inmersión en agua, inyección de toxinas y procedimientos quirúrgicos (Buynitsky y Mostofsky, 2009).

Los factores psicológicos pueden modular el grado de estrés provocado por un estímulo aversivo físico. Por lo tanto, se plantea que variables psicológicas como la falta de predictibilidad, falta de control sobre la situación, y falta de un medio para liberar la frustración modulan al estrés fisiológico (Sapolsky, 2002). La interacción de ambos sistemas generalmente ocurre; esto es, estresores físicos pueden provocar respuestas psicológicas y viceversa (Jöels y Baram, 2009).

4.4 Respuesta del organismo al estrés

Por la década de 1960 se propusieron dos sistemas involucrados en el estrés; uno de ellos, el **sistema simpático adrenomedular**, participa en las respuestas de adaptación rápida y reacciones de “pelea- huida” en donde se activa la liberación de catecolaminas de la médula adrenal a partir de la innervación simpática (sistema nervioso autónomo). El segundo sistema involucrado en el estrés es el **eje HPA** (Hipotálamo- Hipófisis- Adrenal) responsable de la liberación de ACTH (hormona adrenocorticotropa) (Fig. 11) que activa la liberación de glucocorticoides de la corteza adrenal.

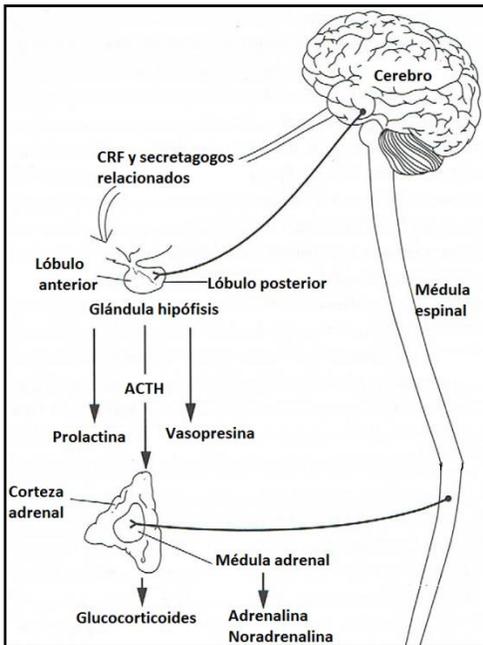


Figura 11: Estimulación del sistema endócrino y neural por el estrés. El estrés produce una liberación de CRH y otros secretagogos por el hipotálamo. Esto ocasiona una liberación de ACTH del lóbulo anterior de la hipófisis el cual estimulará la liberación de glucocorticoides de la corteza adrenal. Durante este estado también se libera prolactina y vasopresina. Además, el sistema nervioso simpático es activado y libera adrenalina y noradrenalina a partir de la innervación colinérgica (ACh). Tomado y modificado de Sapolsky, 2002.

El sistema nervioso autónomo provee la respuesta más inmediata pero de corta duración ante un estresor por vía simpática y parasimpática, provocando rápidas alteraciones en los estados fisiológicos de la innervación de los órganos que se activan ante un estrés. Las

respuestas simpáticas actúan mediante arcos reflejos que comunican con áreas en la médula (del tronco cerebral) y neuronas simpáticas pregangliónicas de la médula espinal. El sistema parasimpático ayuda a controlar la duración de la respuesta autonómica por medio del nervio vago, vía el tracto solitario. Más aún, la médula espinal integra información del romboencéfalo, mesencéfalo y prosencéfalo, los cuales modulan la respuesta autonómica a estresores a partir de la información obtenida del hipotálamo y del prosencéfalo límbico, esto quiere decir que las neuronas del PVN pueden tener un papel en la regulación autonómica y activación simpática consecuente a un estrés (Herman *et al*, 2008; Ulrich-Lai y Herman, 2009).

Por otro lado, ante una alteración a la homeostasis se proyectan fibras nerviosas noradrenérgicas, adrenérgicas y serotoninérgicas hacia las divisiones parvocelulares del PVN que activan al eje HPA. El PVN hipotalámico comprende dos regiones, la región magnocelular, cuyos neuropéptidos más importantes son la Arginina-Vasopresina (AVP) y la oxitocina, y la región parvocelular, que es la principal localización de las neuronas de CRH. Además, en esta última región también se sintetiza y libera AVP, el cual tiene la capacidad de potenciar la acción del CRH sobre la adenohipófisis para la liberación de ACTH. Además de eje HPA, existe un sistema externo al hipotálamo con neuronas productoras de CRH, localizadas en la amígdala que recibe inervación del sistema límbico, el hipocampo y la amígdala basolateral (Ulrich-Lai y Herman, 2009).

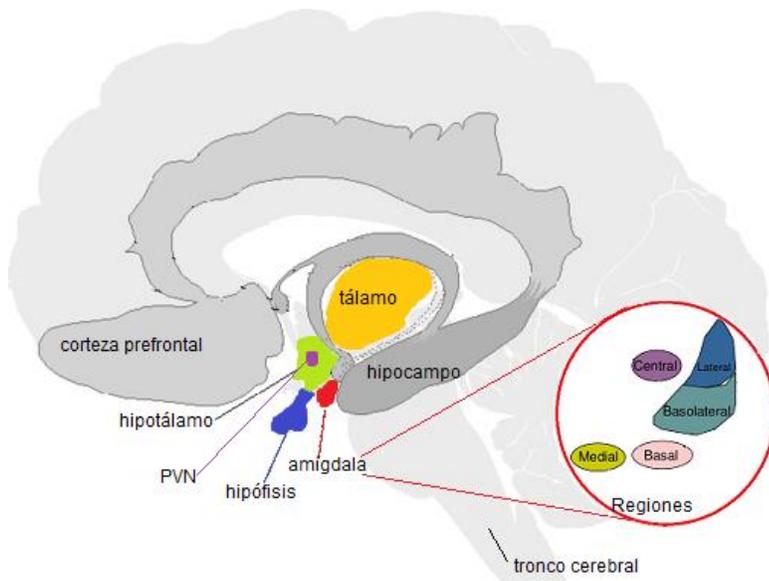


Figura 12: Regiones cerebrales implicadas en la respuesta al estrés

Ante demandas físicas, el eje HPA se activa y genera una **respuesta `reactiva`**; este tipo de respuesta se presenta por estímulos, llamados estresores sistémicos, que representan una amenaza directa a la homeostasis o a la sobrevivencia. Sin embargo, la activación de este eje y la secreción de glucocorticoides también ocurren en ausencia de una amenaza real, lo cual le sirve al organismo para prepararse ante desafíos a la homeostasis. Esta **respuesta `anticipatoria`** depende mucho de la programación innata (ej. predadores) y de experiencias previas (llamadas estresores psicogénicos). Las respuestas anticipatorias, como se mencionó previamente, dependen en gran medida del sistema límbico que es capaz de integrar y asociar eventos externos (Jankord y Herman, 2008).

4.4.1 Estrés agudo

El estrés agudo es de relevancia fisiológica para a vida, es una parte integral de la adaptación de los sistemas biológicos a las condiciones dinámicas y cambiantes del medio ambiente. El estrés agudo involucra situaciones rápidas e inesperadas para el organismo que activan el sistema simpático (sistema nervioso autónomo) y el eje HPA, ocasionan cambios fisiológicos para hacer frente a la situación y es seguido de un retorno a los niveles basales. El estrés puede ser físico, por ejemplo, una hemorragia, el nacimiento, un infarto o una cirugía, o psicológico (o psicogénico) que involucra experiencias previas (Jankord y Herman, 2008).

El PVN es esencial en la respuesta a un estrés agudo, mediante la inducción de la transcripción de los genes de CRH y AVP en las neuronas parvocelulares del PVN. Más aún, la exposición al estrés agudo resulta en la disminución del contenido de CRH de la eminencia media (localizada en la base del hipotálamo) y el aumento en los niveles de CRH y AVP en la circulación. Como reflejo de la expresión inmediata de estos genes, también se activan las neuronas magnocelulares. Por otro lado, también existen regiones cerebrales específicas que son necesarias para la respuesta normal para el estrés agudo como el hipocampo central, la región amigdaloides central (CeA) y medial (MeA) (Herman *et al*, 2008). (Fig. 13).

4.4.1.1 Cambios en la producción de catecolaminas en el estrés agudo.

En la respuesta al estrés, los primeros mediadores a ser liberados por las CCs son las CA. Una vez en el torrente sanguíneo, estas hormonas ejercen múltiples acciones de forma

instantánea, que permite al organismo responder a la amenaza y sobrevivir (Guérineau, 2012). Estos efectos se suprimen en general rápidamente después de su liberación. A diferencia de las CA el cortisol tarda de 20 a 30 minutos en alcanzar sus máximos niveles en sangre, pero este tiene una acción más prolongada (Ganong, 2004).

Durante y después de una cirugía, condición que genera mucho estrés, hay un fuerte incremento en la concentración de A plasmática; por el contrario, aunque también hay un aumento de NA, este no es tan marcado y no supera el umbral donde se producirían cambios fisiológicos (Fig. 13).

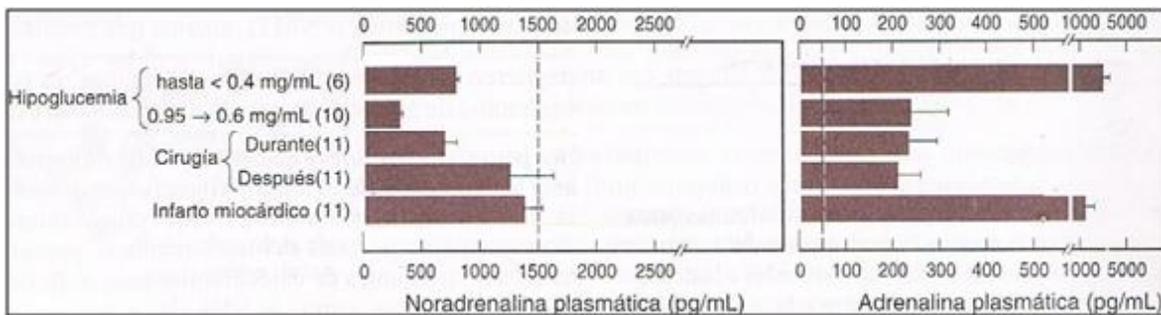


Figura 13: Concentraciones de adrenalina y noradrenalina en la sangre venosa humana en varios estados patológicos. Nótese que las escalas son distintas. Los números entre paréntesis son las cantidades de sujetos probados. La línea punteada vertical identifica la concentración plasmática umbral en la cual se observan cambios fisiológicos. Tomada de Ganong, 2004.

Cuando el nivel de azúcar en la sangre es muy bajo (menor a 70 mg/dl) se cae en una condición de estrés conocida como hipoglucemia. Particularmente, en esta condición aumenta de forma notable el nivel de A plasmática, el cual puede llegar a 2500 pg/ml, 83 veces más que en condiciones de reposo. Esto claramente demuestra el efecto que tiene la A en la movilización de carbohidratos. La Figura 14 muestra como experimentalmente la inyección de insulina (1 unidad/kg) es capaz de generar hipoglucemia, que se acompaña de un incremento importante en la producción de CA pero principalmente de A; debido a que es la A la encargada de movilizar glucosa de los tejidos de reserva como el hígado a través de receptores de tipo β_2 .

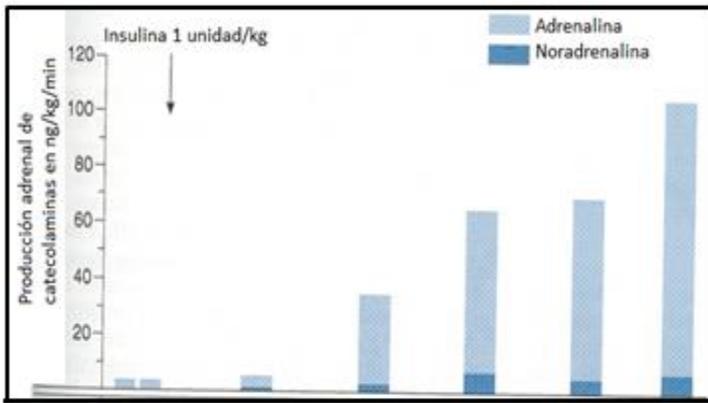


Figura 14: Efectos en la liberación de catecolaminas de la glándula adrenal tras la estimulación con inyecciones de insulina. La insulina provoca una condición de hipoglucemia que es aliviada principalmente por la A que incrementa aproximadamente 20 veces. Tomado y modificado de Yadav, 2008.

4.4.1.2 Mecanismos homeostáticos que regresan a las catecolaminas a su estado basal después de un estrés agudo.

Durante un estrés agudo, una forma de regular la liberación de CA se da a través de la liberación de ATP, el cual se localiza en los gránulos de CA y se secreta junto con estas. El ATP se une a los receptores P_{2Y} -purinoceptores; esto disminuye las corrientes de Ca^{2+} y provee un mecanismo de retroalimentación negativo autócrino-parácrino que resulta en una disminución en la respuesta colinérgica (Kuri, 2010).

Los glucocorticoides además de estimular la síntesis de A a partir de su interacción con el gen de la PNMT, también participan en la inhibición por retroalimentación negativa de la secreción de ACTH que ocurre a los 10 minutos de exposición y el grado de inhibición hipofisaria es proporcional a la concentración de glucocorticoides circulantes (Guyton y Hall, 1997). El efecto inhibitor se ejerce tanto a nivel hipofisario, disminuyendo la secreción de ACTH, como hipotalámico, disminuyendo la liberación CRH (Figura 15). La inhibición se debe principalmente a una acción en el DNA (Ganong, 2004). Esta auto-inhibición de la estimulación para la secreción de cortisol también afecta la síntesis de CA debido a toda la interacción que hay entre éstas y los glucocorticoides previamente descritas.

Otro mecanismo de retroalimentación negativa que regula los niveles de A después de un estímulo estresante se da por esta misma hormona. La A funciona como un inhibidor de la PNMT; por lo tanto actúa como inhibidora de su propia síntesis (Guyton y Hall, 1997).

Existen otros mecanismos que participan en la regulación homeostática de las CA en un estrés, sin embargo aún no se conocen con detalle la forma en la que actúan.

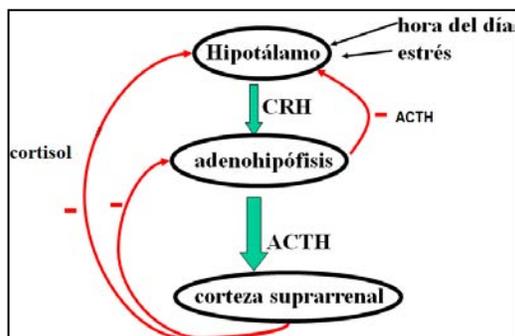


Figura 15: Retroalimentación negativa de los glucocorticoides sobre la secreción de ACTH y CRH.

Entre estos mecanismos esta la síntesis mediada por ACh. Como ya hemos visto con anterioridad la ACh es el principal mensajero que desencadena la liberación de CA; sin embargo, una exposición prolongada a este neurotransmisor provoca la desensibilización colinérgica que se da en la unión receptor-ligando y en la liberación presináptica. La desensibilización también puede ser resultado de la inactivación de los canales iónicos dependientes de voltaje (Na^+ y Ca^{2+}) o un cambio en los procesos de exocitosis que dependen del Ca^{2+} (Kuri, 2010).

Por otro lado, en un estudio realizado por Role y colaboradores en 1981, en CCs en cultivo del cuyo, se ha encontrado que la sustancia P y la somatostatina inhiben la secreción de CA inducida por ACh. La inhibición máxima producida por la sustancia P y la somatostatina es del 60% aproximadamente y la concentración de estos péptidos requerida para producir la mitad de la inhibición máxima es de 0.8 y 2 μM , respectivamente. También demostraron que esta inhibición actúa específicamente en los receptores nicotínicos además es no competitiva con respecto a la concentración extracelular de ACh, Na^+ o Ca^{2+} ; así mismo, dado que ni la sustancia P ni la somatostatina inhiben significativamente la secreción de CA dada por alto potasio o veratridina, podemos pensar que estos péptidos no afectan a los canales de Na^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje que son activados por estos agonistas. Adicionalmente, ninguno de los péptidos afecta significativamente la secreción en ausencia de agonista, su acción no es aditiva, es decir no hay mayor inhibición con una concentración más grande de ambos, e incluso su efecto inhibitor es completamente reversible.

En general, estos péptidos pueden actuar como inhibidores no competitivos de la unión de la ACh a su receptor, o como inhibidores de canales iónicos ligados al receptor en las CCs. Además, su efecto no aditivo sugiere posiblemente inhiban la secreción por un mecanismo común (Role *et al*, 1981).

4.4.2 Estrés crónico

El estrés crónico considera situaciones prolongadas de varios días, semanas e incluso años, las cuales mantienen activados los mecanismos del estrés. Cuando la situación que provoca la respuesta al estrés (respuesta general a un tipo de estímulo) se vuelve crónica y/o excesiva y no es posible mantener los valores de regulación dentro de la homeostasis es cuando se puede llevar al desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas como, por ejemplo, diabetes, obesidad, hipertensión, ansiedad y depresión. La respuesta al estrés va a depender de la forma en que el cerebro procesará dicha información. Esto depende de la experiencia e información aprendida, e incluso de la carga genética del individuo, su desarrollo prenatal, neonatal, factores nutricionales y eventos experimentado durante el desarrollo (Fig. 16) (Levine y Ursin, 1991).

En un estrés crónico hay hipersecreción de glucocorticoides, hipertrofia adrenal, incremento en la actividad del eje HPA, pues se reduce la eficacia de la retroalimentación negativa por glucocorticoides, hay una mayor respuesta a nuevos estresores e incluso se presentan comportamientos similares a la depresión. Estos efectos pueden estar asociados a cambios en las vías centrales de la regulación del eje HPA, incluyendo principalmente las que regulan las respuestas ante un estrés psicogénico, como es el caso de la amígdala basolateral, una región de la amígdala y la corteza prefrontal medial que regulan las respuestas anticipatorias en el estrés crónico (Fig. 12) (Jankord y Herman, 2008). Asimismo, se conoce que todas las regiones del PVN participan en la respuesta al estrés crónico. Por lo tanto, en las neuronas hipotalámicas, en donde puede haber plasticidad morfológica (cambios en el tamaño celular e inervación de GABA y glutamato), se reduce la expresión de los receptores a glucocorticoides y a GABA e incrementa la expresión del receptor a glutamato (Herman *et al*, 2008).

4.4.2.1 El estrés sostenido y las patologías crónicas.

De acuerdo a Sapolsky en el 2002, durante el estrés crónico el metabolismo se altera secundariamente a la constante movilización de energía por la ruptura de proteínas almacenadas para liberar aminoácidos a la circulación producen miopatía, debilidad y fatiga. También por la constante lipólisis, glucogenólisis y gluconeogénesis. Por otro lado, se genera daño del músculo cardíaco, secundario a la alteración crónica del sistema circulatorio, que debilita la pared de los vasos sanguíneos y promueve el depósito de colesterol y la formación de placas ateroscleróticas.

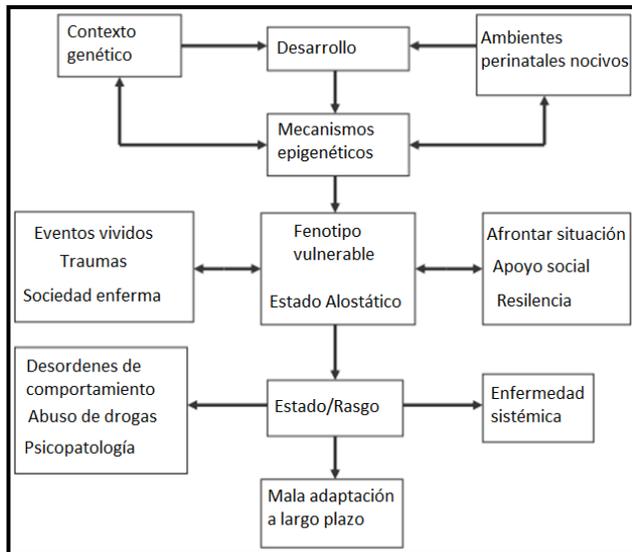


Figura 16: Representación sintética de los factores que llevan a una mala adaptación y a la enfermedad. Los periodos pre y post natales, así como la adolescencia son críticos para la adquisición de fenotipos vulnerables. Imagen tomada y modificada de Le Moal (2007).

Durante el estrés el sistema parasimpático se inhibe (Revisión Sapolsky, 2002). Esto puede causar úlceras gástricas ya que el flujo sanguíneo a esta área se inhibe, por lo que la liberación de oxígeno y nutrientes se reduce y si esta situación se prolonga, las paredes del estómago se vuelven débiles y necróticas y son más susceptibles a bacterias, en este caso a *Helicobacter pylori*, bacteria involucrada en las úlceras y la gastritis. Así mismo, cuando la respuesta al estrés es prolongada, la secreción de moco y el engrosamiento de las células de la pared estomacal se reducen y ambas actividades son importantes para proteger contra los ácidos gástricos. Además los glucocorticoides, que también aumentan importantemente durante el estrés, inhiben a las prostaglandinas, las cuales normalmente reparan lesiones gástricas (Sapolsky, 2002).

Otro sistema inhibido en el estrés es el reproductor. Se ha documentado que en las hembras disminuyen los niveles de progesterona e incrementan los de prolactina, hormona que disminuye la sensibilidad de la hipófisis a GnRH (hormona liberadora de gonadotropina), por lo tanto no hay una maduración normal de la pared uterina. En los machos hay una disminución en los niveles de testosterona y en situaciones muy extremas se reduce la producción espermática; esto debido a que los glucocorticoides disminuyen la sensibilidad testicular a LH (hormona luteinizante) y al igual que en las hembras hay una menor sensibilidad de los gonadotropos hipofisarios a la GnRH (Sapolsky, 1991, en Rev. Sapolsky, 2002). Otro efecto encontrado en los machos está relacionado con problemas en la erección y eyaculación debido a la alteración que se provoca en la alternancia de la activación del sistema parasimpático (participa en la erección) y el simpático (participa en la eyaculación) (Rev. Sapolsky, 2002).

En el estrés se afecta el anabolismo, el cual es un proceso muy importante y constante en los animales jóvenes y en crecimiento. Aunado a esto también se produce una disminución en la hormona del crecimiento (GH), sobre todo debido al incremento en la liberación de somatostatina, por lo que el crecimiento se interrumpe. En adultos, el aumento de los glucocorticoides, se traduce como una inhibición en la reparación de tejidos lo cual puede producir, por ejemplo, osteoporosis, debido al aumento en el nivel de glucocorticoides, como se ha probado farmacológicamente en humanos y fisiológicamente en primates sometidos a estrés social (Shively *et al*, 1991, en Rev. Sapolsky).

Por último, se ha reportado ampliamente que los glucocorticoides inhiben: la liberación de citocinas y los niveles de sus receptores, la liberación de interleucinas (IL-1), y la producción de proteínas del complemento (necesario para la destrucción de células mediada por anticuerpos); además, bloquean la maduración de linfocitos, promueven su destrucción y se inhibe la respuesta proliferativa del sistema inmune (Sapolsky, 2002). Estudios recientes indican que en realidad, inmediatamente después de un estresor hay un incremento en la respuesta inmune y los glucocorticoides ayudan al sistema inmune a regresar a sus niveles basales (Munck *et al*, 1984; Sapolsky *et al*. 2000 en Rev. Sapolsky, 2002). Sin embargo, como se ha citado arriba, durante situaciones de estrés crónico los glucocorticoides provocan una disminución de esta respuesta por debajo de sus niveles basales lo que puede llevar al

desarrollo de enfermedades infecciosas e incluso juega un papel importante en el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como el cáncer (Sapolsky, 2002). Se muestra un resumen en la tabla 3.

Respuesta al estrés	Consecuencia patológica cuando se prolonga
Movilización de energía a partir de almacenes	Fatiga, miopatía, diabetes esteroidea
Incrementa tono cardiovascular y cardiopulmonar	Hipertensión
Supresión de la digestión	Ulceración
Supresión del crecimiento	Afecta el crecimiento, descalcificación ósea
Supresión de la reproducción	Anovulación, impotencia, pérdida de libido
Supresión de la inmunidad y la respuesta inflamatoria	Deterioro de la resistencia a las enfermedades y asociación a enfermedades crónico degenerativas.
Analgesia	
Respuesta neuronal, alteración en la cognición y umbrales sensoriales	Aceleración de la degeneración neural durante el envejecimiento.

Tabla 3: Los principales componentes de la respuesta al estrés y su consecuencia patológica Modificado de Sapolsky, 2002.

4.5 Mecanismos de regulación que incrementan las catecolaminas en el estrés.

El estrés crónico, además de aumentar la liberación de catecolaminas, provoca cambios sostenidos y/o progresivos en la expresión de ciertos genes, alteraciones estructurales en neuronas, además de la activación constante de los sistemas del estrés (Jöels y Baram, 2009).

4.5.1 Efectos del cortisol en la PNMT

Es bien conocido que la concentración local sanguínea de cortisol estimula la expresión e induce la actividad de la enzima PNMT en la médula adrenal. Así mismo, que el cortisol regula a la alta los receptores α_1 adrenérgicos y sensibiliza a los tejidos tanto para la A como para la NA (Kacsoh, 2000; Ganong, 2004).

Se ha reportado que periodos de inmovilizaciones únicas y repetidas en ratas incrementan marcadamente el RNAm (Ácido Ribonucleico mensajero) de la PNMT en la médula adrenal. Por otro lado, también se ha demostrado que después de una inmovilización (IMO) aguda (30 minutos) la CORT aumenta rápidamente (Tai *et al*, 2007). En ratas sometidas a RES de movimiento, se ha encontrado que el pico de A y NA se da a los 5

minutos, en cambio, el de CORT se da hasta los 30 minutos de exposición (Livezey *et al*, 1985).

La inducción de PNMT es rápida y depende en gran parte a la liberación de glucocorticoides inducida por el estrés. La respuesta de la actividad de PNMT con los glucocorticoides se debe a que en el promotor del gen de esta enzima existen 3 elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) (Figura 17). Gracias a esto, regulan a la PNMT en 2 formas: aumentando su RNAm así como post-traduccionalmente, previniendo la degradación de esta enzima (revisión Kvetňanský *et al*, 2013). Asimismo, se ha reportado (Tai *et al*, 2007) que el estrés por IMO (crónico o agudo por 30 o 120 minutos) también induce un aumento en el RNAm y la proteína del Egr-1 y la Sp1 e incluso eleva la fosforilación de estos factores de transcripción para permitirles una mejor interacción con sus respectivos sitios de unión en el DNA del promotor de la PNMT. Rio arriba de la secuencia del promotor del gen de la PNMT se encuentran secuencias que regulan y activan la transcripción por su interacción con Egr-1, AP-2 y Sp1 los cuales pueden interactuar cooperativamente para incrementar el transcrito de la PNMT además de sus contribuciones individuales (Figura 17).

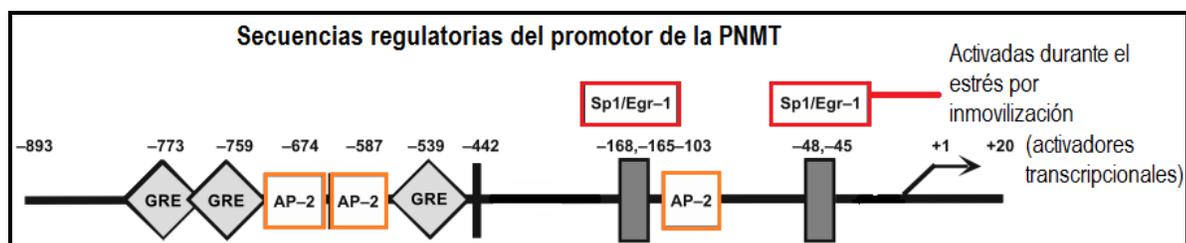


Figura 17: Diagrama del promotor del gen que codifica para la PNMT. Se muestran algunas secuencias regulatorias y su ubicación así como los sitios en donde actúan algunos factores transcripcionales. GRE: elemento de respuesta a glucocorticoides; AP-2: proteína activadora 2; Sp1: proteína específica 1; Egr-1: proteína 1 de respuesta temprana al crecimiento (Tomado y modificado de la revisión de Wong y Tank, 2007).

4.5.2 Cambios en las enzimas que sintetizan y metabolizan CA durante el estrés.

El estrés altera la síntesis de las CA de la médula adrenal a través de la actividad de tres enzimas clave: la TH, la DBH y la PNMT. La actividad de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos no cambia durante este estado.

La médula adrenal rápidamente responde a un estresor activando genes individuales debido a la estimulación colinérgica. En contraste, los ganglios simpáticos responden especialmente a la activación del eje HPA (Sabban y Kvetnansky, 2001).

Aumentos breves e intermitentes en la actividad simpática incrementan la actividad de la TH, vía fosforilación de moléculas de TH existente en residuos de serina localizados cerca del N-terminal; esta regulación a corto plazo por fosforilación hace a la TH menos susceptible a ser inhibida por las CA. Por otro lado, una activación simpática sostenida también aumenta la actividad de la TH pero mediante un incremento en el número de moléculas, es decir, un aumento en su transcripción (Haycock, J. 1996).

Eventos únicos y repetidos de estrés por IMO llevan a un incremento de unas 3 veces en el inicio de la transcripción génica de TH y DBH a comparación de los animales control. Además, experimentalmente, se ha visto que un único estresor de 5 min ocasiona un aumento de unas 3 a 4 veces en la tasa de transcripción de ambos genes. Por lo tanto, la transcripción de TH y DBH es casi tan rápida como el aumento en los niveles de glucocorticoides suprarrenales provocado por el estrés, ya que con una IMO de 5 minutos los niveles de estas enzimas están incrementados de 3 a 4 veces. Sin embargo, este aumento es transitorio si el estrés no es prolongado. Después de un estrés crónico (2 hrs. diarias por varios días consecutivos), la activación de la transcripción de TH y DBH se estabiliza y se eleva significativamente incluso 24 hrs. después de la última exposición al estrés. Asimismo, la IMO repetida mantiene los niveles del RNAm de ambas hormonas elevados en los ganglios simpáticos y en la médula adrenal, pero no produce un mayor incremento comparado con los niveles ya elevados de los controles adaptados. Por otro lado, en el cerdo de guinea se ha reportado que la acetilcolina no únicamente incrementa la secreción de catecolaminas, sino también ocasiona un aumento en la actividad de la TH. En consecuencia, la elevación de la transcripción de las enzimas biosintéticas de CA es parte de un mecanismo de adaptación del organismo a estresores homotípicos y de largo plazo (Nankova, Tank, & Sabban, 1999).

Se ha reportado que en estrés crónico ya se encuentran elevados tanto el transcrito como la proteína de la TH, mientras que en el agudo sólo el transcrito (Wong y Tank, 2007).

Se han caracterizado varios elementos de respuesta en donde actúan factores de transcripción que regulan la expresión de la TH inducida por el estrés; estos incluyen a: CRE, AP-1 y posiblemente SP1/Egr-1 (Figura 18) (Revisión Wong y Tank, 2007). También, como ya se dijo, se conoce que la actividad de esta enzima es regulada por los nervios pre-gangliónicos y los niveles intracelulares de los compuestos de catecol (circuito corto de retroalimentación negativa).

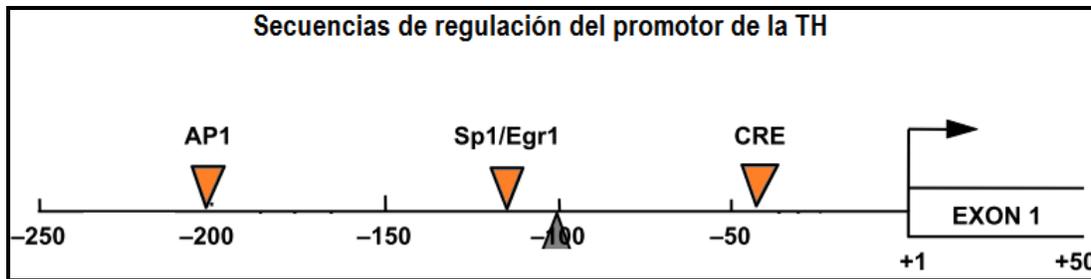


Figura 18: Mapa físico del promotor del gen que codifica para la TH. Se aprecian algunas secuencias que participan en la regulación de esta enzima durante el estrés. AP1: proteína activadora 1; Sp1: proteína específica 1; Egr-1: proteína 1 de respuesta temprana al crecimiento; CRE: elemento de respuesta a AMPc (Tomado y modificado de la revisión de Wong y Tank, 2007).

En cuanto a las enzimas que metabolizan a las CA, se ha encontrado que durante el estrés por IMO aguda (2 hrs) decrece la actividad de la MAO en homogenados de hígado de ratas (medido por radioquímica). Adicionalmente, la actividad de MAO disminuye en los ganglios simpáticos en animales predispuestos al estrés después de un estresor, mientras en los sujetos resistentes al estrés, aumentó. También, sujetos inmovilizados de forma crónica han mostrado baja actividad de la COMT en la glándula adrenal; e incluso, los niveles de RNAm de esta enzima disminuyeron significativamente en el hígado de ratones adultos estresados (revisión Kvetňanský *et al*, 2013).

De lo anterior, tanto la reducción en el proceso de degradación junto con el incremento en la producción, liberación y secreción de CA inducidas por el estrés, generan una mayor disponibilidad de CA para los receptores adrenérgicos y para la actividad incrementada en los procesos metabólicos y fisiológicos durante el estrés. En el estrés aumentan los transportadores vesiculares de CA, VMAT. Esto puede generar un mayor almacén y por lo tanto disponibilidad de estas hormonas en las vesículas (revisión Kvetňanský *et al*, 2013).

Podemos encontrar otros mecanismos que promueven una mayor liberación de CA durante el estrés; por ejemplo, existen neuromoduladores que se liberan del nervio esplácnico y participan en la regulación de la secreción de CA como son la histamina y angiotensina II. Éstas provocan una despolarización de la membrana celular de la célula cromafin y la subsecuente exocitosis de catecolaminas. Su forma de acción no está bien dilucidada pero se sabe que sus mecanismos difieren a los de la ACh (Kuri, 2010).

4.6 Técnicas para medir CA

Los niveles de CA plasmáticas están determinados por sus tasas de entrada y eliminación de la circulación. Existen muchos factores que modifican la concentración plasmática de A y NA, desde la postura, el consumo de café y cigarro, cualquier tipo de estrés e incluso la edad (Kopin, 1985).

Los niveles plasmáticos de catecolaminas funcionan como índices de la actividad simpática en la médula adrenal debido a su rápida remoción de la sangre (vida media < 2 min.) y normalmente sus niveles basales son muy bajos (300 pg/ml para la NA y 30 pg/ml para la A en humanos). Por lo tanto cambios en sus concentraciones nos indica alteraciones en su liberación (Kopin, 1985).

La cuantificación de CA y sus metabolitos en tejidos es menos frecuente que en muestras de fluidos, ya que el plasma y la orina son más fáciles de colectar y muy relevantes clínicamente. Por lo general, la extracción de catecolaminas de tejidos requiere de una homogenización o sonicación de los mismos con algún tipo de solvente como ácido perclórico o buffer de fosfatos (Bicker, 2013). En la literatura existen muchos trabajos en donde se tratan los métodos existentes para la medición de CA, sobre todo plasmáticas, como los fluorescentes, inmunoenzimáticos y cromatográficos, los cuales serán tratados a continuación (tabla 4).

Técnicas de medición de catecolaminas	
Fluorometría o detección por	El anillo bencénico de las catecolaminas hace que estos compuestos sean naturalmente fluorescentes, pero su fluorescencia nativa no es suficiente para cuantificar pequeñas concentraciones de CA en muestras biológicas, por lo tanto para detectarlas se realiza una

fluorescencia	reacción de derivatización con agentes fluorescentes los cuales oxidan el grupo catecol; esto es seguido de una tautomerización catalizada por una base para formar derivados altamente fluorescentes como el trihidroxiindol (THI) o bien, mediante una derivatización con 1,2-difenyletilenediamina (DPE) que origina derivados benzoxazoles que son detectados a 345 nm (excitación) y 480 nm (emisión) (Bicker, <i>et al</i> , 2013).
Cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC)	Las mezclas moleculares se separan que dependiendo de las afinidades diferenciales de los solutos entre dos fases no miscibles En la cromatografía líquida la separación se produce dentro de una columna empaquetada. El material de empaque es la fase estacionaria y puede ser un sólido con capacidades adsorptivas o de exclusión y se usa una fase líquida como eluyente. En la técnica de HPLC, la fase móvil es forzada con una bomba a través de la columna empaquetada bajo alta presión. En este método se obtienen eficiencias muy altas (Gennaro, 2003). Existen varios tipos de detecciones cromatográficas empleadas para catecolaminas: la de quimioluminiscencia, espectrometría de masas, fluorescencia y electroquímica. Una de las más usadas es la electroquímica; en este tipo de detección, las catecolaminas se oxidan a un potencial predeterminado convirtiéndolas a quinonas. La corriente generada en la reacción es directamente proporcional a la concentración del analito en la solución (Bicker <i>et al</i> , 2013).
Inmunoensayo (Kit- ELISA)	Las CA de las muestras y los estándares se extraen en una placa con gel de boronato, se acilan con un buffer de acilación y son transformadas enzimáticamente a N-acilmetanefrina o normetanefrina. Estas CA aciladas y transformadas enzimáticamente compiten con las CA unidas a la fase sólida (tiras ELISA) por un sitio de unión de anticuerpo de conejo (A1). Este anticuerpo (A1) unido a las CA se une a otro anticuerpo contra ellas (A2), una IgG anti-conejo con peroxidasa. La peroxidasa, en presencia de 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB), genera una reacción colorimétrica la cual se determina a 450 nm. La cantidad de anticuerpo unido a la fase sólida de catecolaminas es inversamente proporcional a la concentración de catecolaminas en la muestra (Eagle Biosciences).

Tabla 4: Se muestran de forma muy general 3 métodos de medición de CA.

4.7 Modelos de estrés

Existe una gran variedad de modelos experimentales para inducir estrés tanto físico como psicológico (Tabla 5) (Buynitsky y Mostofsky, 2009). Los modelos animales son la mejor aproximación que tenemos para estudiar y entender la fisiología y en este caso los mecanismos bio-psico-sociales del estrés. En la investigación con animales es posible controlar el estímulo de estrés, el cual puede variar en la amplitud, duración, tipo de energía y nivel de complejidad, así como el registro en la respuesta determinada por niveles de CA, ACTH y corticoides entre otros (Levine y Ursin, 1991; Kopin, 1995). A continuación se presentan un resumen de algunos modelos empleados para observar cambios en las hormonas del estrés.

Modelo de estrés	Animal	Tiempo de estrés	A plas	NA plas	A glan	NA glan	CA orina	CORT	Referencia
Peleas mutuas	Ratones macho	14 días	↑	↑					Tizabi et al, 1976
Nado forzado	Ratas macho	9 semanas/1 h diaria	↑						Moreau et al, 1979

Frío	Ratas macho	4°C, 5 días continuos	↑44%	↑36%	↓25%	↓38%			Colomer et al, 2008
RES + alteraciones en la luz y el sonido. Periodo de reposo.	Ratas macho	10 min	3-7 veces					↑ 2 veces	Vogel y Jensch, 1988
		3 semanas 1-2 hr diarias	=	=				↑ 10 veces	
Inmovilización IMO	Ratas macho	2.5 h/día por 40-350 días						↑	Kvetňansky y Mikulaj, 1970.
		90 min.			↑ ligera	=			
Restricción de movimiento RES	Ratas macho	30 o 120 min.			↓	=		↑	Tai et al, 2007
	Ratas macho	30 o 120 min por 7 días			=			↑ 10-12 veces	
Restricción de movimiento RES	Ratones macho ICR	2 horas por 15 días						↑ 5 veces	Jeong et al, 2013
	Ratas macho y hembra	5, 15 y 30 min.	↑	↑	pico a los 5 min.			↑ Pico a los 30 min	Livezey et al, 1985
	Ratas	Agudo			↑ 6 veces	↑ 8 veces	Incrementan a los 30 min, pero disminuyen después de 50 min.		Sánchez et al, 2003

Tabla 5: Resumen de cambios en los niveles hormonales en diferentes compartimentos y modelos de estrés. Estos cambios constituyen la evidencia de que estos modelos son útiles para el estudio del estrés en otras variables fisiológicas. Los incrementos (↑) y disminuciones (↓) están dados en comparación a los controles. Plas= plasma, glan= glándula, CORT= corticosterona.

4.7.1 Las CA durante el estrés fisiológico

El nacimiento constituye uno de los ejemplos más claros de estrés fisiológico.

La sensibilidad a bajas concentraciones de oxígeno es el principal mecanismo mediante el cual el feto libera catecolaminas al momento de su expulsión. Con la estimulación del sistema cardiovascular y respiratorio, las catecolaminas contribuyen a la habilidad del organismo de sobrellevar la falta de oxígeno durante el parto, proteger los órganos de daños severos y mantener la homeostasis. Esta experiencia inicial ante el estrés ocurre cuando la inervación simpática aún no se ha establecido (la inervación simpática ocurre al día 7 postparto), por lo que en la regulación de la secreción durante el parto se ha postulado que participan importantemente las uniones comunicantes y canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Rev. Guérineau, 2012).

Para estudiar este tipo de estrés, se usa un modelo de hipoxia intermitente (HI). Se reemplaza una porción del aire inhalado con nitrógeno para reducir periódicamente el porcentaje de oxígeno hasta 10% por 15 segundos seguido de 5 min de O₂ a sus valores normales (21%) en sujetos experimentales o cultivos celulares (Guérineau, 2012).

4.7.2 Las CA durante el estrés psicológico: Modelo de estrés por restricción

De acuerdo a la revisión realizada por Buynitsky y Mostofsky (2009), el estrés por RES es probablemente el más popular y uno de los más utilizados para inducir estrés psicológico en roedores. Elegimos este modelo para el proyecto ya que no causa ningún daño físico ni dolor; esto asegura que los efectos a largo plazo del estrés observado se deben al estresor aplicado y no como repercusión de alguna lesión dado que otros protocolos de estrés pueden ocasionar daño físico (Grandin y Deesing, 2002).

Existe un número de variaciones para realizar la RES se emplean distintos dispositivos para restringir el movimiento o inmovilizar como tubos rígidos (más usado), alambres, cajas especiales, superficies pegajosas, bolsas y toallas (Buynitsky y Mostofsky, 2009). La RES difiere de la IMO, en la cual cada pata del animal se sostiene con una pinza o se pega a una tabla y el animal está con las 4 patas extendidas y colocado sobre su espalda; también se puede restringir el movimiento de la cabeza colocando anillos metálicos alrededor del cuello (Kvetňansky y Mikulaj, 1970).

Hay variación en la frecuencia de la RES (número de sesiones por día o semana), duración (tiempo de exposición durante cada sesión) e intensidad (grado de IMO o RES al que el roedor es sometido) (Buynitsky y Mostofsky, 2009).

Los cambios más estudiados y observados en el estrés por RES incluyen cambios inmunológicos, en la ingesta de etanol y en el comportamiento, así como aumento en los niveles plasmáticos de ACTH, CORT (Jeong et al, 2013; Livezey *et al*, 1985) y CA (Kvetňansky, 1985; Livezey *et al*, 1985) disminución en el consumo de alimento y en el peso (Jeong *et al*, 2013), cuestiones que se tratarán más adelante (Fig. 22). Sin embargo, en algunos casos la RES e IMO no producirán una respuesta al estrés, ya sea debido a las condiciones intrínsecas del sujeto de estudio, a que no se aplicó una intensidad o duración suficientes o a que el animal se habituó a la situación (Buynitsky y Mostofsky, 2009).

II. ANTECEDENTES

En este proyecto se utilizó un modelo psicológico pseudo-crónico (5 días) de RES, ya que no causa ningún daño físico ni dolor.

Comparación de niveles de CA en IMO aguda y crónica.

En 1985, Kvetňansky y colaboradores encontraron que los niveles de CA plasmáticas en ratas sujetas a IMO repetidas (150 minutos por 6 semanas), fue de 1.67 veces mayor al de los animales inmovilizados por única ocasión (150 min) y 4 veces mayor en comparación a los sujetos control (no estresados) (Fig. 19).

El mismo grupo comparó el cambio temporal en los niveles de las CA de ratas inmovilizadas durante 150 minutos durante 40 días y aquellas estresadas por un solo día. Los investigadores encontraron que durante los primeros 20 min los niveles de las CA plasmáticas fueron menores en las ratas con estrés crónico con respecto a las expuestas a un estrés agudo; sin embargo, el nivel de CA a los 60 y 120 min fue el mismo entre las ratas de estrés crónico como del agudo (Fig. 20). Este resultado, contradictorio al experimento previo, podría deberse al tipo de sacrificio empleado, en el primero (Fig. 19) los animales son decapitados, esto provoca un estímulo intenso y novedoso por lo que los sujetos crónicamente inmovilizados liberan mayores cantidades de CA a comparación de los expuestos a estrés agudo (Kvetňansky *et al*, 1985).

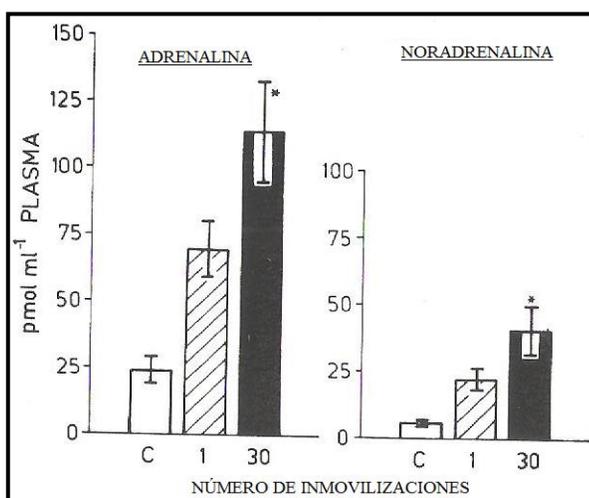


Figura 19: Catecolaminas plasmáticas en ratas con IMO aguda y repetida, sacrificadas por decapitación.*p < 0.05 comparado con el grupo de IMO. Tomado y modificado de Kvetňansky *et al*, 1985.

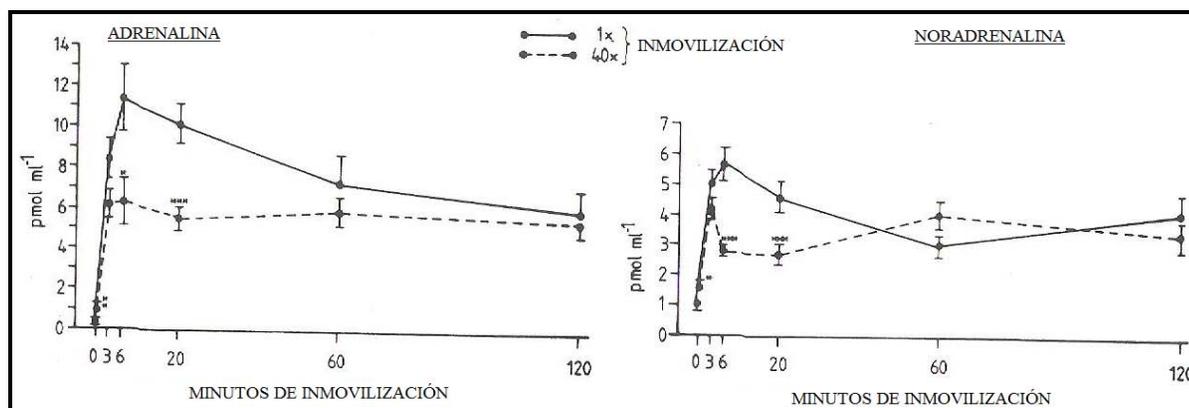


Figura 20: Cambios temporales de catecolaminas plasmáticas en ratas cateterizadas e inmovilizadas 40 veces ($n = 9-12$) durante 150 min. Todos los valores de estrés incrementan significativamente a comparación del grupo control no estresado, pero solo hay significancia estadística los primeros 20 minutos en comparación del grupo 1x. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ comparado con el grupo 1x. Tomado y modificado de Kvetňansky *et al* (1985).

Efecto de la RES en el peso corporal y la ingesta de alimento de ratones.

Además de los cambios hormonales mencionados, también existe evidencia de que el estrés disminuye el peso corporal y la ingesta de alimento en modelos animales. La pérdida de peso inducida por estrés es pequeña, va del 5 al 15%, en diferentes experimentos, pero siempre es estadísticamente significativa (Harris *et al*, 2006). Jeong *et al* (2013) en un modelo de estrés crónico por RES (2 hrs por 15 días) en ratones ICR, encontraron una disminución del peso corporal de 2.5 g desde el quinto día y se consumió menos alimento desde el primer día (1 g) de iniciado el estrés (Fig. 21). En este modelo la restricción está asociada a una disminución significativa en el RNAm de la grelina y un aumento en el mensajero de la POMC; visto por estudios de microarreglos y qRT-PCR. También aumentan los niveles hormonales de la corticosterona y disminuyen los de leptina. Esto indica que el estrés puede afectar a los genes que regulan el peso y la ingesta de alimento. Además, está bien establecido que la administración aguda y crónica de CRF inhibe la ingesta de comida (Hotta *et al*, 1991). El efecto parece estar mediado por la inhibición la acción orexigénica del neuropéptido Y (Heinrichs *et al*, 1992) y promoviendo la expresión de POMC, que es una proteína anorexigénica (Hotta *et al*, 1991).

Harris *et al*, 2006, también reportan que la restricción de 3 horas por 3 días disminuye el peso de las ratas y que puede tener un impacto de larga duración (hasta >2 meses).

Proponen que esto puede deberse a que se alteran los mecanismos regulatorios que normalmente promoverían la hiperfagia ya que también los animales disminuyen su ingesta de alimento durante el periodo de restricción (Harris *et al*, 2006). Asimismo, encontraron que el estrés aumenta la termogénesis en el tejido adiposo café y la oxidación de ácidos grasos; además se sabe que el estrés aumenta la actividad del sistema simpático lo cual activa la proteína desacoplante 1 en la mitocondria en donde se desvía la producción de ATP hacia la producción de calor.

Por último, en ratones KO para el receptor de serotonina 5HT_{2C} se ha observado que disminuye ingesta de alimento ante un estrés pseudocrónico por RES (4 días por 15 min diarios) (Chou-Green, *et al*, 2003).

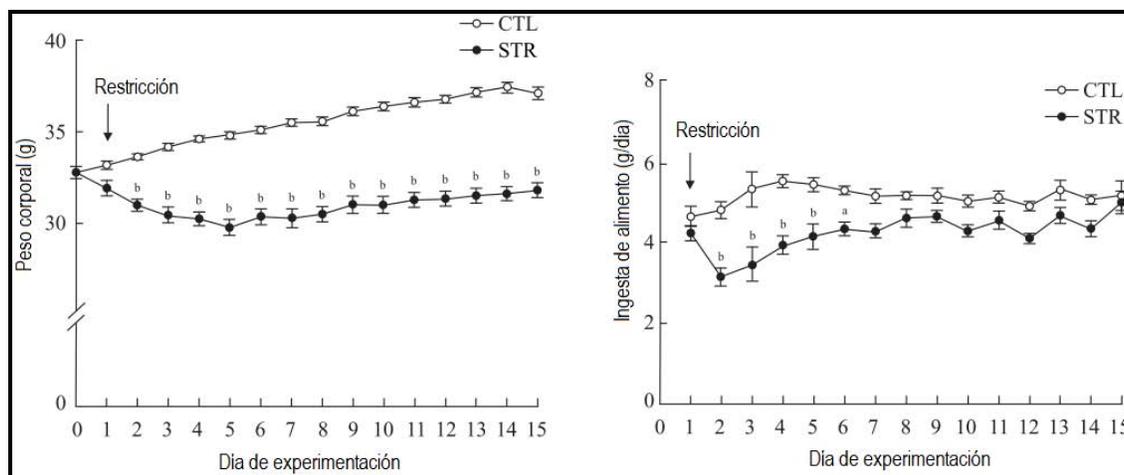


Figura 21: Efectos del estrés por RES en el peso corporal y la ingesta de alimento. Expuestos 2 hrs, durante 15 días consecutivos en tubos cilíndricos de acrílico. ANOVA de 2 vías. Datos presentados como media \pm SEM. a $P < 0.05$, b $P < 0.01$. Ratones estrés (STR) contra ratones control (CTL). Tomado y modificado de Jeong *et al* (2013).

Estudios de estrés en el modelo de ratón C57BL/6

La cepa C57BL/6, fondo genético para la generación de diferentes tipos de ratones transgénicos, ha sido un modelo previamente estudiando en diversos protocolos de estrés: por RES crónica (Hotchkiss *et al*, 2004; Mustafa *et al*, 2015), por RES aguda (Mustafa *et al*, 2015), por RES crónica (Chou-Green *et al*, 2003) y aguda (Chourbaji *et al*, 2008) con más de un tipo de estresor (manipulación y cambio de jaula en crónico; nado forzado y choque eléctrico en las patas para el agudo), por aplicación crónica de manganeso (Martínez *et al*, 2004), por exposición aguda a ratones (Brinks *et al*, 2007) y por la provocación de un estado de choque por hemorragia (Tsunoda *et al*, 2001).

En el protocolo de estrés por nado forzado (6 min), choques eléctricos (52 min en distintos intervalos de tiempo y duración) y RES aguda (30 min) (1 hr de intervalo entre cada estresor), llevado a cabo por Chourbaji y su grupo de trabajo (2008), los niveles de CORT en suero aumentaron significativamente por la RES y el nado forzado, pero no por los choques eléctricos. Esto también se observa en el protocolo de restricción crónica y pseudocrónica llevado a cabo por Hotckiss *et al* (2004) y Chou-Green *et al* (2003) respectivamente, en donde aumentan los niveles de CORT.

En otro estudio, Mustafa y colaboradores (2015) investigaron el impacto del estrés por RES aguda (3 horas) y crónica (2 horas diarias por 7 y 21 días) en ratones C56BL/6 KO para PACAP (péptido activador de la adenilato ciclasa de la hipófisis) y su receptor (PAC1). Ellos encontraron una mayor elevación en los niveles de CORT en los ratones silvestres que en los deficientes a PACAP durante el estrés agudo y crónico con una aparente falta de participación del receptor PAC1 hasta el séptimo día, pero todos los valores siendo mayores en comparación a los ratones control.

Para investigar el cambio en las catecolaminas por algún tipo de estrés, Martínez y su grupo de trabajo (2004) midieron las catecolaminas en el cerebro de ratones C57 y albinos tratados crónicamente (5 días por semana durante 9 semanas, 5mg Mn/Kg/día) con manganeso sin encontrar cambios significativos en comparación a los ratones control. Por otra parte, Tsunoda *et al* (2001) encontraron que los niveles plasmáticos de A y NA aumentan (A: 60 veces, NA: 10 veces) en ratones anestesiados, después de generarles un choque hemorrágico de la arteria carótida.

III. JUSTIFICACIÓN

El ritmo de vida de la sociedad actual aunado a los problemas económicos, sociales e incluso de contaminación ambiental ha aumentado las situaciones que generan y el tiempo al cual estamos expuestos al estrés. En la actualidad el estudio del estrés está tomando gran relevancia pues permite comprender y explicar la fuente de muchas enfermedades del hombre moderno. Los estudios epidemiológicos muestran el incremento sostenido en enfermedades crónico degenerativas y trastornos mentales asociadas al estrés, de ahí que es de suma relevancia entender los mecanismos celulares que regulan al mismo.

Los roedores se han empleado como modelos para estudiar las respuestas fisiológicas ante el estrés. Es posible rastrear desde 1980 publicaciones relacionadas con cambios plasmáticos de los niveles de CA y CORT durante varias situaciones de estrés agudo, sin embargo un número mucho menor de estos se han enfocado al estrés pseudocrónico y de largo plazo. En cuanto a la especie, la mayor parte de estos estudios se han realizado en ratas. Sin embargo, como se resumió previamente existen algunos estudios en ratones C57BL/6 que son comúnmente utilizados para generar animales KO o deficientes en genes específicos. De lo anterior nos pareció importante generar un modelo de estrés pseudocrónico en esta cepa, con el fin de que el presente modelo pueda ser utilizado para estudios de regulación de la producción de CA, y posteriormente permitirá entender la forma en que el estrés afecta al ser humano a nivel fisiológico y posiblemente genético.

IV. HIPÓTESIS

- El modelo psicológico de estrés por restricción de movimiento aplicado durante 5 días (2 horas diarias), en el ratón C57BL/6, generará un modelo de estrés pseudo-crónico, el cual irá acompañado de una disminución en el contenido de noradrenalina y adrenalina de la glándula adrenal, y disminuirá el peso corporal de los ratones estresados.

V. OBJETIVOS

GENERAL

- Sustentar que el modelo de RES por 2 hrs diarias durante 5 días genera estrés en la cepa de ratón C57BL/6, disminuyendo el contenido total de CA de la glándula suprarrenal.

➤ OBJETIVOS PARTICULARES

- 1) Comparar los niveles de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) de la glándula suprarrenal de ratones estresados y control, medidos con la técnica de HPLC con detección electroquímica
- 2) Identificar si el estrés pseudocrónico genera un cambio en la ingesta alimento y en el peso de los animales sujetos a estrés con respecto a los controles.

VI. METODOLOGÍA

1. Modelo experimental utilizado en este estudio

Se usaron ratones machos de 2 a 3 meses de edad de la cepa C57BL/6 procedentes del bioterio de la Unidad de Investigación en Medicina Experimental, fondo genético para la generación de diferentes tipos de ratones transgénicos. Se ha reportado que los ratones C57 son hiperactivos, mostrando una alta actividad locomotora y una mayor ansiedad en comparación de otras cepas (129 Sv/Ev y SW) (Van Bogaert *et al*, 2006). Lo anterior es de utilidad para probar si el esquema elegido es suficiente para generar una condición de estrés reproducible

2. Protocolo del modelo de estrés

2.1 Habitación al bioterio experimental

Los sujetos se mantuvieron en un cuarto a temperatura ambiente y con un fotoperiodo 12:12 (L:O). Se alojaron individualmente en cajas de plástico con paja esterilizada, agua embotellada y una dieta estándar de galletas *ad libitum* (Harlan Teklad Extruded Global Rodent Diet: proteína mínima 19%, grasa cruda mínima 9% y fibra cruda máximo 5%). Diariamente, a un mismo horario (9-12 hrs), se pesó a los ratones y se llevó un registro de la cantidad de agua y comida consumida. Para pesar a los ratones y el alimento que consumieron se empleó una báscula especial para roedores y a fin de poder medir la ingesta de líquido rápidamente, se adaptaron como bebederos probetas de plástico de 100 ml. Después de 7 días de aclimatación al bioterio (manipulación y registro de presión arterial), los ratones se asignaron a 2 grupos, uno control ($n= 10$) y uno experimental: estrés por RES ($n= 10$), tomando como criterio el peso de los animales; esto es, de dos ratones con pesos similares, se colocó uno en un grupo y el otro en el otro grupo para lograr una distribución homogénea de los pesos.

2.2 Exposición al estrés

A ambos grupos se les continuó el registro de peso y alimentación en el mismo horario que durante el periodo de adaptación. Aunado a esto se les tomó la presión arterial (datos no mostrados). El impacto de este modelo en el tejido vascular fue investigado por otra alumna; no obstante, basta resumir que la RES pseudocrónica aplicada no afectó este parámetro.

El grupo experimental fue expuesto por 5 días a la RES de movimiento, mediante la introducción del ratón por 2 horas en un tubo de plástico de 50 ml con perforaciones que garantizaban su adecuada ventilación, los cuales se colocaron dentro de sus jaulas (Fig. 22). En la rata, este protocolo se ha reportado que es suficiente para inducir ansiedad y estrés (Buynitsky y Mostofsky, 2009).

2.3 Obtención de muestras

Obtención de glándulas adrenales. Los animales se expusieron brevemente a cloroformo (10 segundos aproximadamente) para anestesiarnos. Una vez dormidos fueron decapitados con guillotina (Fig. 23A). Inmediatamente se obtuvo la sangre en tubos eppendorf de 1.5 ml y ambas glándulas suprarrenales se removieron (Fig. 23B) y se les eliminó la grasa y el tejido circundante bajo el microscopio estereoscópico con PBS. Posteriormente se colocaron en tubos de vidrio pequeños y se congelaron en nitrógeno líquido y/o en hielo seco para guardarlas a -80°C hasta su procesamiento.

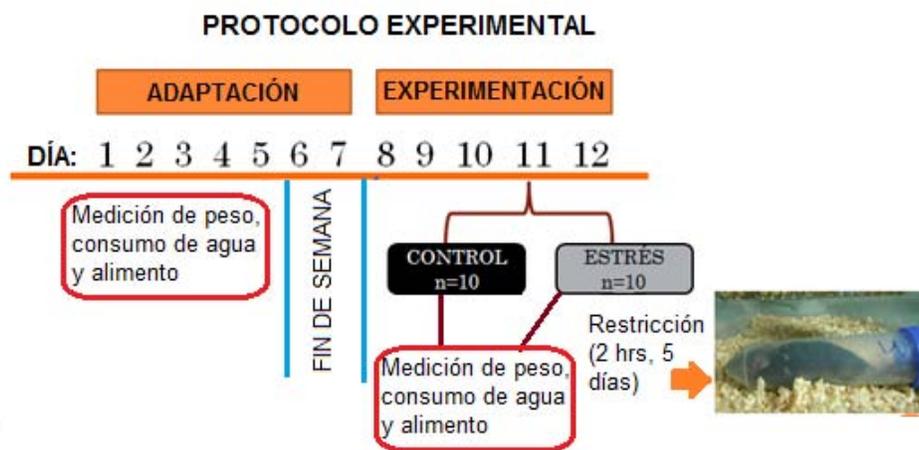


Figura 22: Protocolo experimental. En el periodo de experimentación los ratones se inmovilizaron por 2 h diarias durante 5 días (grupo estrés).

2.4 Procesamiento de las glándulas suprarrenales para HPLC.

Las muestras se pasaron a 4°C para permitir que se descongelaran y durante todo el procedimiento se mantuvieron en hielo. A continuación a cada tubo se le agregó $200\ \mu\text{l}$ de ácido perclórico (HClO_4) 0.1N (70%, Fluka), filtrado (Pirinolas con membrana de PVDF (polifluoruro de vinilideno) de $0.22\ \mu\text{m}$, Millipore) y preparado con agua Mili Q. Con una micropipeta de $1000\ \mu\text{l}$ se pasaron las glándulas de cada sujeto, con los $200\ \mu\text{l}$ HClO_4 a

tubos eppendorf de 1.5 ml, donde se homogenizaron completamente (homogenizador para tubos eppendorf Pellet pestle, disponible, Sigma Aldrich). 120 μ l del homogenado se pasaron a tubos de ultracentrífuga y se centrifugó por 2 min a 37 000 rpm (160 000 x g) (Rotor 42.2 Ti, Beckman Colter ultracentrifuge optima XL-100K). El sobrenadante se colocó en tubos para filtración (filtro de nylon de 0.22 μ m, Millipore). Se centrifugó por 2 minutos a 2382 rpm (520 x g) (Rotor 11192 y 13041, Centrífuga Sigma 2-16KL). El filtrado se guardó a 4°C para su análisis en el cromatógrafo por un intervalo no mayor a 24 horas.

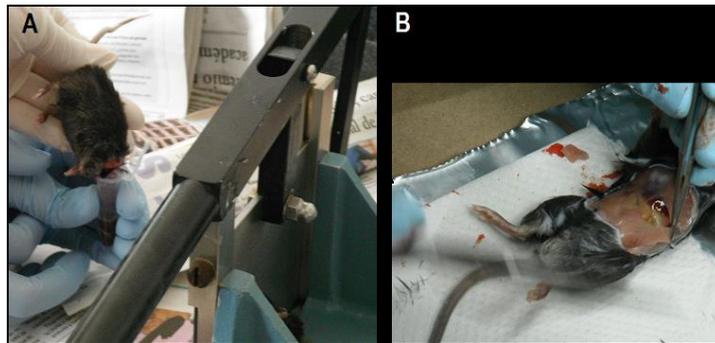


Figura 23: Obtención de sangre(A) y glándulas adrenales (B).

2.5 Determinación de proteínas totales (suprarrenales): Método de Bradford

El método empleado para la detección de proteínas totales fue Bradford-Espectrofotometría visible (595 nm). Esta prueba realiza una determinación colorimétrica y se basa en el acoplamiento del colorante azul de Coomasie con la proteína. Existe una relación directa entre el desarrollo del color y la concentración de proteínas. Con este método las proteínas tienen una capacidad de absorción máxima de 466 nm, eso cambia a 595 nm cuando el colorante (contenido en el reactivo de Bradford) está unido a las proteínas (Bradford, 1976). La ventaja de este método es su simplicidad, sensibilidad, su rapidez y bajo costo de reactivos. Sin embargo, este ensayo es sensible a sufrir interferencias con varios reactivos como detergentes iónicos y no iónicos y proteínas glicosiladas, pero ha resultado ser efectivo para reportar la cantidad de catecolaminas analizada por HPLC (Noble y Bailey, 2009).

Para hacer la determinación, se preparó una solución patrón de Albúmina Sérica Bovina (BSA powder, MB biomedical.) 1 mg/mL en un tubo de 1.5 ml. A partir de esta solución se tomaron alícuotas (10, 7.5, 5, 2.5 y 0 μ l) y se completaron los volúmenes con

agua Mili Q hasta 800 µl en tubos independientes. Por otro lado, la pastilla obtenida después de la ultracentrifugación, de cada uno de los homogenados, se resuspendió con 200 µl de NaOH 0.1 M (Sigma Aldrich) y con una pipeta pasteur. De la pastilla resuspendida se tomaron 2 µl y se les agregaron 798 µl de agua Mili Q para obtener un total de 800 µl.

Una vez preparados los estándares de referencia y las muestras, se adicionaron 200 µl del Reactivo de Bradford (Bio-Rad Protein Assay) a cada una, alcanzando un volumen total de 1 ml y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de incubación las muestras se leyeron en espectrofotómetro a 595 nm (Beckman Coulter DU 530, Life Science UV/Vis Spectrophotometer). Gracias a los estándares de referencia, el espectrofotómetro construyó la curva estándar con valores conocidos (correlación de 0.986) e interpoló las absorbancias obtenidas de las muestras experimentales arrojando la concentración de proteína total en mg/ml.

2.6 Análisis de las muestras por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC).

La fase líquida antes descrita fue utilizada para la cuantificación de A y NA. Debido a los altos niveles de analito presentes en los homogenados se realizó una dilución 1:250, con ácido perclórico 0.1 N (70%, Fluka) filtrado, de cada muestra para evitar la saturación del equipo. Utilizando una jeringa de vidrio Hamilton de 50 µl, se inyectaron 40 µl de la dilución a un sistema de HPLC (Antec Leyden) equipado con un detector electroquímico (basado en la detección de la corriente producida por la oxidación/reducción del analito) (Intro, Waters Co.) y una bomba isocrática (pasa una sola fase móvil y la desgasifica para evitar problemas de burbujas en el equipo) (515 HPLC Pump Waters). Para la separación de las muestras, el sistema cromatográfico consistió de un inyector (Rheodyne) con un asa de 20 µl (contenedor de la muestra) que conducía a una columna dC-18 (Ascentis 4.6 x 100 mm).

La composición de la fase móvil fue: 166 mg/L de EDTA (Sigma Aldrich), 9.48 g/L de ácido monocloroacético (Sigma Aldrich), 166 mg/L de Ácido 1-octanesulfónico (OSA) (Sigma Aldrich), pH de 3.2 ajustado con NaOH (Sigma Aldrich) y 45 ml/L de acetonitrilo (J.T. Baker). Se filtró con una membrana de nylon de 0.22 µm (Millipore) y se des-gasificó con agitación y vacío (agitador magnético conectado a bomba de vacío). El flujo de la fase móvil fue de 0.9 ml/min a 35°C (en la bomba isocrática). La A y NA de los homogenados fueron detectadas por oxidación electroquímica con un electrodo de carbono vidriado (VT-03, Antec Leyden)

fijado a un potencial de 0.380 mV, a un rango de 0.1 x 100 y un filtro de 0.5. La señal del detector electroquímico fue recibida por un conversor analógico-digital (SAT/IN Module Waters BUS). La información se procesó utilizando el programa Empower Pro 2002,8 Waters Co.).

Para detectar y posteriormente obtener la concentración de cada analito de interés primero se elaboró la curva estándar o de calibración de la A y la NA. Para esto, al cromatógrafo se le inyectó una concentración conocida de A (Epinephrine Bitartrate, Sigma Aldrich) y NA (Arterenol, Sigma Aldrich) de 10, 20, 40 y 80 nM. Se obtuvo el cromatograma de cada concentración como vemos en la figura 24 y posteriormente mediante el software del propio equipo (Empower, Waters Corp., Milford, Massachusetts), se calculó el área bajo la curva con el método de integración de Riemann (suma de Riemann). Estos datos obtenidos de área bajo la curva, se pasaron a una hoja de Excel (Microsoft Excel 2010) en donde se graficaron los valores, área bajo la curva vs concentración (nM), obteniendo las curvas de regresión lineal de cada analito (Fig. 25) en donde se cuidó que el valor del coeficiente de correlación R^2 fuera \geq a 0.99 para poder ser usados como valores de referencia.

Para cuantificar la concentración de A y NA de cada muestra, se obtuvo el área bajo la curva y después se interpolaron los valores, empleando el programa estadístico GraphPad Prism (Versión 6.01 para Windows, GraphPad Software, Inc. San Diego California, USA). Los valores obtenidos de concentración (nM) se recalcularon considerando el factor de dilución (1:250) y se pasaron a μg por mg de proteína con el calculador de molaridad TOCRIS (herramienta en línea: TOCRIS, Bioscience, Bristol, UK.).

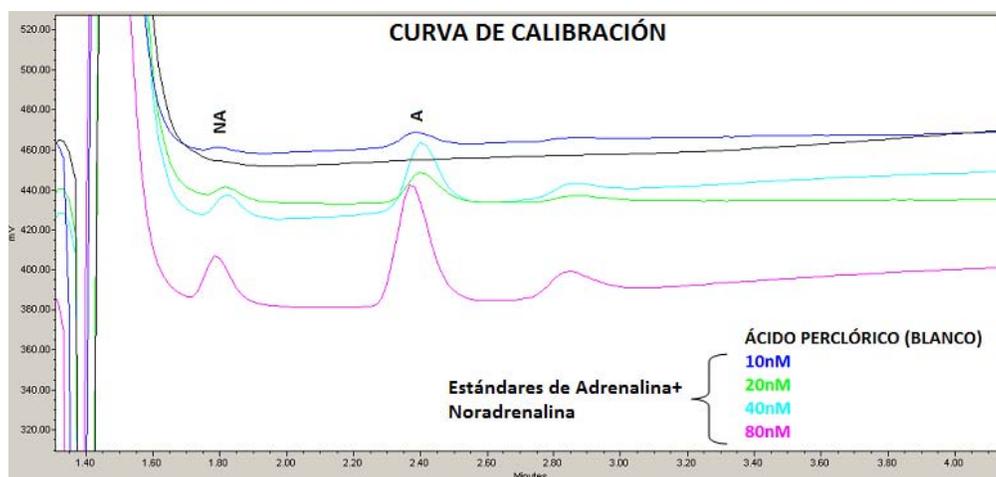


Figura 24: Curva de calibración de los estándares de Adrenalina (A) y Noradrenalina (NA).

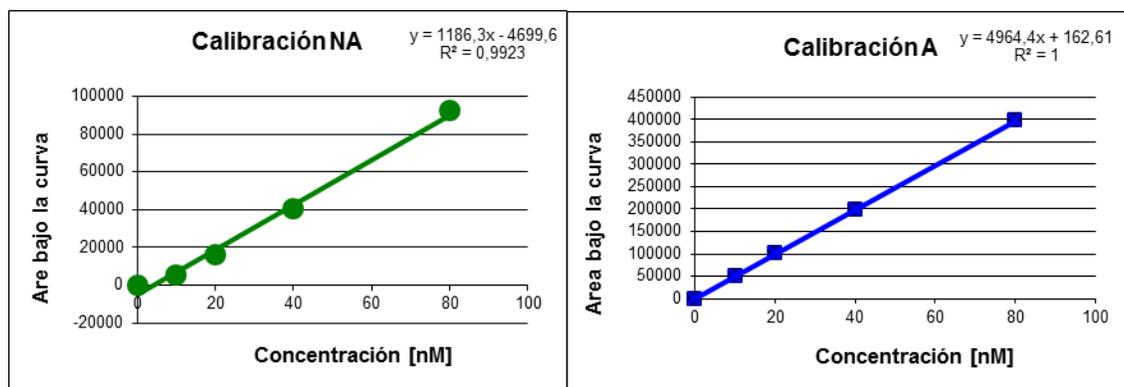


Figura 25: Curvas de regresión lineal de la Noradrenalina (NA) y la Adrenalina (A) obtenidas calculando el área bajo la curva del cromatograma de la Figura 23. El coeficiente de correlación de ambos estándares es mayor a 0.99.

2.7 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad Prism (Versión 6.01 para Windows, GraphPad Software, Inc. San Diego California, USA).

Los promedios \pm S.E.M. del peso y del consumo de alimento en los ratones controles y estresados durante la semana experimental, fueron calculados y comparados por la prueba t-student no pareada (prueba paramétrica para datos con distribución normal) usando una significancia de $p < 0.05$. El promedio de la ingesta de agua se analizó mediante la prueba de U de Mann Whitney (prueba no paramétrica para una distribución no normal) de comparación de medianas, usando significancia de $p < 0.05$. Estos parámetros se analizaron con el fin de ver el efecto del estrés por RES de movimiento. Se graficó el promedio \pm S.E.M.

El promedio de los porcentajes de cambio del peso y de la ingesta de agua se analizó con la prueba de U de Mann Whitney usando significancia de $p < 0.05$. Para analizar el aumento o disminución en el consumo de alimento en la semana experimental con respecto a la de adaptación se empleó la prueba de t-student no pareada usando una significancia estadística de $p < 0.05$. Se graficó el promedio de los porcentajes de cambio \pm S.E.M.

Los promedios \pm S.E.M de la concentración de adrenalina y noradrenalina (analitos) fueron calculados y comparados en los ratones controles y estresados empleando una ANOVA de 2 vías (factor 1 grupo, estresado y control; factor 2, NA y A), empleada para evaluar el efecto de la condición de estrés en la concentración de cada analito. Posterior a un

ANOVA significativo se aplicó la prueba *post hoc* de Bonferroni para las comparaciones múltiples. Se empleó una significancia de $p < 0.05$. Se graficó el promedio \pm S.E.M.

VII. RESULTADOS

1. Efectos del estrés por RES en la ingesta de agua, alimento y en el peso

1.1 Agua consumida

La figura 26 A, muestra el promedio de agua diaria consumida de todos los animales control (barra negra 4.66 ml) y experimentales (barra gris 5.11 ml). Aunque hay un incremento durante la semana experimental, no es significativo ($P=0.359$). No obstante, en la figura 26 B podemos observar que cuando se grafica el cociente de la ingesta de agua durante la semana de experimentación con respecto a la de control, si se alcanza una diferencia estadística significativa ($P < 0.05$), ya que el grupo de ratones estresados incrementó su consumo de agua en un 10%, mientras que el del control lo disminuyó en un 13% (Fig. 26 A).

En la figura 26 B, la línea naranja corresponde al 100%. Este 100% es el valor del promedio de agua consumida durante la semana de adaptación de todos los individuos; los valores por encima de esta línea muestran un aumento en el consumo de agua durante la semana experimental y valores por debajo de ella, una disminución. Para cada grupo se calculó el porcentaje de cambio [% de cambio = (Promedio de agua ingerida en el periodo de experimentación \times 100) / Promedio de agua ingerida en el periodo de adaptación].

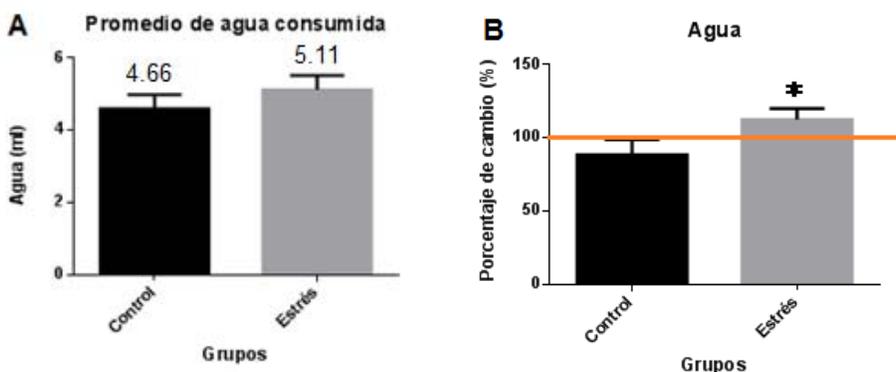


Figura 26: A) Promedio (SEM) de agua consumida entre ratones control y estrés durante el periodo experimental. No hay diferencia significativa entre ambos grupos. $P=0.359$ ($P > 0.05$) Prueba Mann-Whitney. **B) Porcentaje de cambio (SEM) de agua consumida en la semana experimental con respecto a la semana de adaptación.** Los ratones estresados consumen más agua y los controles disminuyen un poco su ingesta. Este cambio alcanza una significancia. Prueba Mann-Whitney. $P < 0.05$

1.2 Alimento consumido

La figura 27 A, presenta el promedio de alimento consumido al día por los ratones de ambos grupos, tanto estrés como control durante el periodo experimental. El promedio de alimento consumido fue de 3.4 gr diarios, pero sin encontrar diferencias significativas entre ambos ($P=0.90$).

La gráfica 27 B, muestra el porcentaje de cambio de consumo de alimento del grupo control (barras negras) y experimental (barras grises), con respecto a la semana de adaptación. Podemos observar que ambos grupos consumieron aproximadamente entre un 14 (control) y un 18% (estrés) menos de comida durante la semana experimental. Sin embargo, estos valores al compararse entre sí, no logran una diferencia significativa ($P=0.584$).

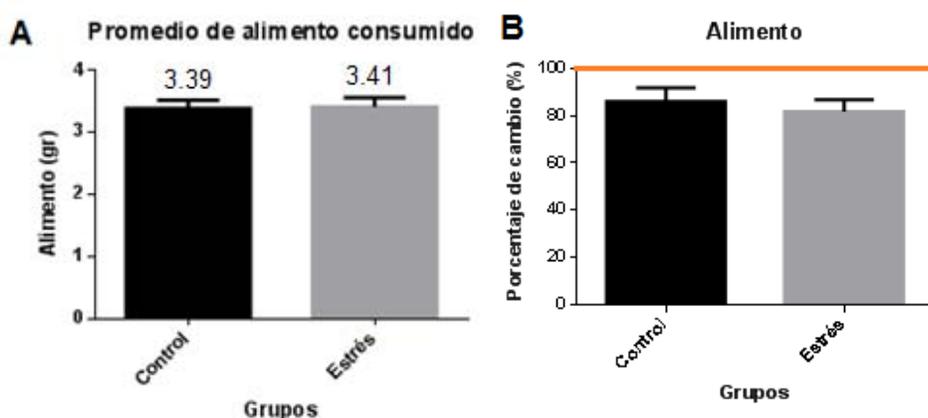


Figura 27: A) Promedio (SEM) de alimento consumido entre ratones control y estrés durante el periodo experimental. No hay una diferencia significativa entre ambos grupos. Prueba T-student $P>0.05$. **B) Porcentaje de cambio (SEM) del alimento consumido en la semana experimental con respecto a la semana de adaptación** Aunque en ambos grupos disminuye la ingesta, no hay diferencia significativa entre los grupos. Prueba T-student. $P>0.05$

1.3 Peso

La figura 28 A muestra el promedio de pesos de los ratones del grupo control (barra negra) y el grupo estrés (barra gris). Como se puede observar, ambos grupos mantuvieron un peso promedio de 23 gr sin presentar una diferencia significativa entre ellos ($P=0.98$). La figura 28 B muestra el porcentaje de cambio del promedio de peso de cada grupo, adquirido en la semana experimental con respecto a la semana previa de adaptación. Durante la semana experimental hay un ligero aumento del 3.5% en el peso de los ratones control y de 4.4% en

los estresados sin ser estadísticamente diferentes ($P= 0.310$), lo cual indica que no hay cambios en el peso de los ratones durante la semana de experimentación.

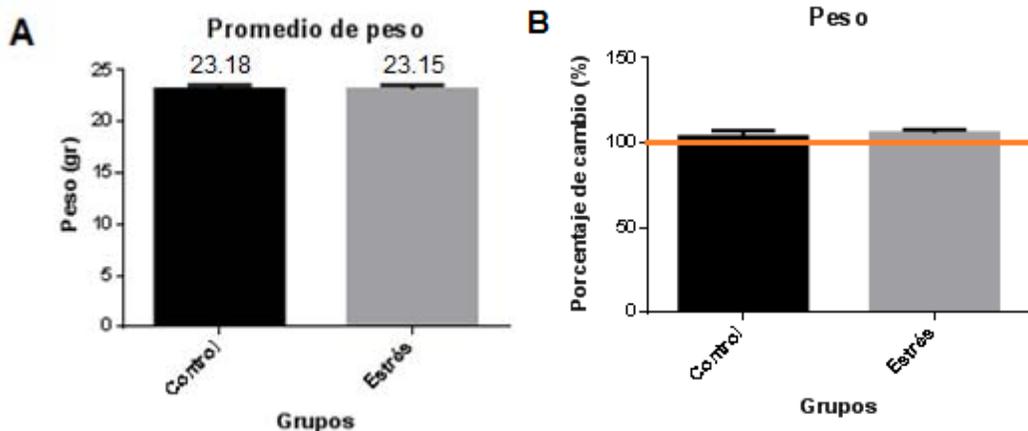


Figura 28: A) Promedio de peso (SEM) entre ratones control (n=10) y estrés (n=10) durante el periodo experimental. No hay una diferencia significativa entre ambos grupos Prueba T-student. $P>0.05$ B) **Porcentaje de cambio (SEM) del peso adquirido en la semana experimental con respecto a la semana de adaptación** No hay diferencia significativa. Prueba Mann-Whitney ($P>0.05$).

2. Análisis del contenido total de catecolaminas de la glándula adrenal de los ratones en estudio.

Para los experimentos aquí presentados, el promedio del tiempo de retención de la NA fue de 1.76 min y el de la A de 2.34 min para todas las muestras, tanto de animales control como estresados. Esta información es relevante ya que concuerda con los tiempos de retención obtenidos en la curva patrón de los estándares químicos de ambas CA. Gracias a esto, podemos identificar los picos que corresponden a cada analito de interés.

La Figura 29 muestra un cromatograma representativo para un sujeto control y uno sujeto al esquema de RES. En esta gráfica, se observa que el pico de A es mayor que el de NA en las dos muestras. Esto es consistente con la literatura, en donde se reporta que el contenido de A en la glándula suprarrenal está en una relación de 3:1 con respecto a la noradrenalina. Así mismo, los picos de ambas CA fueron mayores en los sujetos control con respecto a los experimentales; tendencia que se observa en todos los animales analizados.

El contenido de NA fue ligeramente mayor al de A en ambos grupos. La figura 30 muestra una gráfica de barras en la cual se aprecian los cambios en los niveles de NA y A expresados en ng de analito por mg de proteína, de acuerdo a la condición de estudio,

ratones control y estresados. Los niveles de NA y A disminuyen significativamente ($F_{(1,36)}=16.77$; $p < 0.01$) en los sujetos expuestos a estrés por RES de 2 horas por 5 días.

Para el grupo control ($n=10$) se obtuvo un valor promedio de 153.497 ng/mg de proteína y de 110.040 ng/ mg para la NA y la A respectivamente. Por otra parte, para el grupo estresado ($n=10$) se encontraron niveles promedio de 78.596 ng/mg para la NA y de 53.076 ng/mg para la A; es decir, hubo una disminución del 48.8% en el contenido total de NA y de 51.76% en el caso de la A.

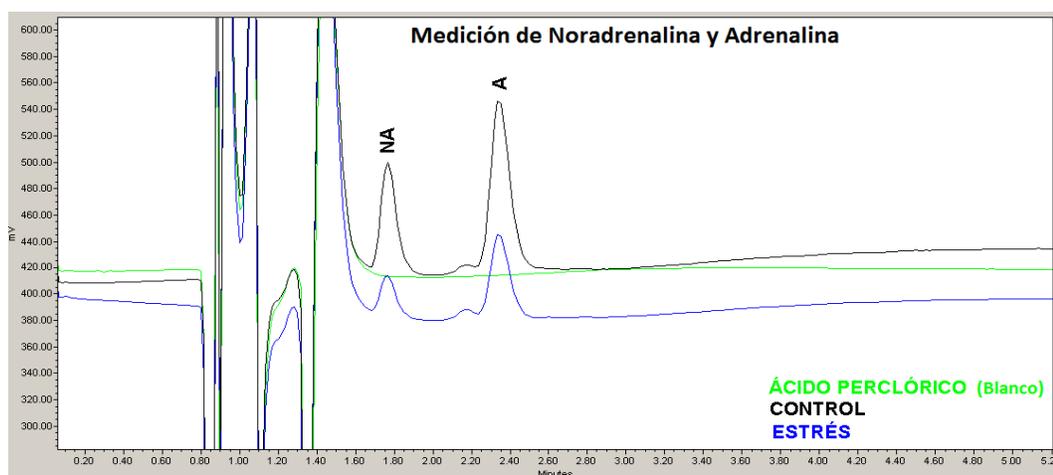


Figura 29: Cromatograma representativo en donde se compara la medición de los analitos de interés (Adrenalina= A y Noradrenalina=NA) en una muestra de cada grupo de estudio.

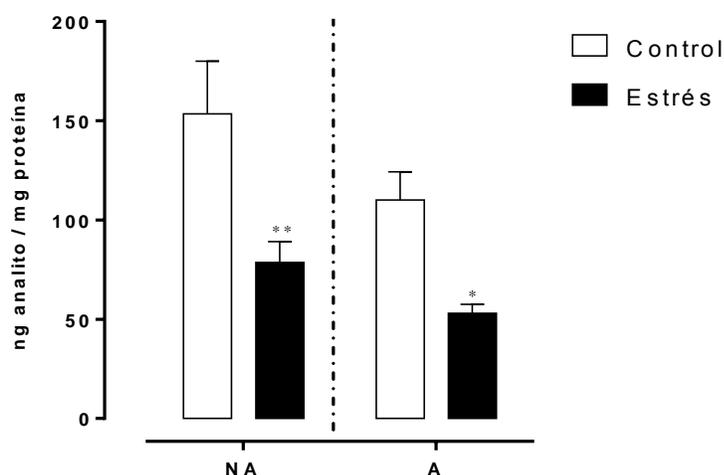


Figura 30: Promedio (SEM) de los niveles de NA y A de los grupos de estudio ($n=10$ para cada uno). La condición de estrés afecta de la misma forma tanto a la NA como a la A (Interacción condición X analito no significativa, $F_{(1,36)}=0.3103$; $p=0.581$). La concentración de cada analito disminuye significativamente en los sujetos estresados (Post hoc de Bonferroni) * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

VIII. DISCUSIÓN

1) Cambio en la ingesta de agua

En los animales estresados aumentó la ingesta relativa de agua durante el periodo experimental con respecto al periodo de adaptación (Fig. 26 B). El aumento en el consumo de agua de los animales sometidos a estrés puede explicarse por el hecho de que durante las 2 hrs de RES hay un aumento en la temperatura corporal (Hotchkiss *et al*, 2004) por lo que sudan para poder regular su temperatura. Este efecto en la temperatura corporal se debe a que el incremento en la oxidación de ácidos grasos y en la actividad simpática generada durante el estrés aumenta la termogénesis (Harris *et al*, 2006). En este experimento observamos que inmediatamente después de salir del estrés, los ratones tomaban grandes cantidades de agua, seguramente para recuperar la perdida.

El único estudio encontrado, en donde miden la ingesta de agua, es en un protocolo de estrés por RES aguda (30 min) realizado por Tabarin, *et al* (2007) en ratones macho de la cepa C57BL/6. Estos investigadores encuentran que durante las 4 horas posteriores a la RES, los ratones sometidos a estrés consumen significativamente menos agua, pero la consumen más rápido y en un periodo de tiempo más corto. Esto complica bastante la comparación de este resultado con lo encontrado en el presente estudio ya que ellos sólo registran la ingesta unas horas después del estrés y no cuantifican el consumo total en 24 horas. Sin embargo, es relevante mencionar que Tabarin y colaboradores también observan una ingesta acelerada de agua después del estrés, que es justo lo que podríamos estar observando nosotros en este trabajo. Por lo tanto no podemos asegurar que el aumento en el consumo de agua sea un efecto del estrés por RES pseudocrónico ya que tampoco se encontró una diferencia con respecto al grupo control.

2) Estrés en el peso y el consumo de alimento

En el presente estudio no encontramos alteraciones en el peso, sugiriendo que el esquema de RES por 5 días no altera los centros hipotalámicos del apetito. La ingesta de alimento y la disminución en el peso corporal están altamente relacionados; por esta razón es inusual que en este trabajo los ratones no cambiaran su peso corporal pero que mostraran una tendencia

a disminuir su ingesta de alimento en la semana de experimentación, aunque sin presentar diferencia significativa contra el grupo control (Fig. 27B).

Diferentes estudios han reportado que el estrés por RES tanto agudo como crónico reduce la ganancia de peso corporal y la ingesta de alimento en roedores (Mustafa *et al*, 2015; Jeong *et al*, 2013; Harris *et al*, 2006; Hotchkiss *et al*, 2004 y Chou-Green *et al*, 2003).

De acuerdo a la literatura, ratones de la cepa C57BL/6, cuando son sujetos a estrés por RES, por unos días (pseudocrónico, 4 días por 15 min diarios) (Chou-Green *et al*, 2003) o en forma aguda (30 min) (Tabarin *et al*, 2007), reducen su ingesta de alimento. También Jeong *et al*, (2013) reporta que los ratones de la cepa ICR (Siglas de Institute of Cancer Research) reducen su ingesta de alimento y peso corporal cuando se les somete a RES por 15 días (2 horas diarias). Por otro lado, Hotchkiss *et al* (2004) encuentran que tanto la cepa CD1 como la C57BL/6 pierden masa corporal después de 3 días de RES (9 horas dispuestas en 3 intervalos de 3 horas cada uno), siendo esta pérdida mayor en los ratones de la cepa C57. Lo anterior muestra que el estrés altera el consumo de alimento y el peso en diferentes especies y cepas.

La disminución de peso reportada resulta de una menor ingesta de alimento o bien de un aumento en la digestión y en la eliminación de los desechos a través de las heces. Alternativamente los individuos en estrés están sujetos a una mayor demanda energética y aumento en la temperatura corporal, consecuencia de la actividad metabólica provocada por las hormonas del estrés (CORT y A). Más aún, en estos estudios ambos investigadores reportan periodos de experimentación más largos (15 días) o con mayor duración (estímulo de 3 horas 3 veces al día) a los usados en esta tesis, así como el uso de ratones transgénicos, lo cual puede explicar el hecho de que nosotros no encontráramos cambios en el peso corporal.

Gracias al trabajo de Jeong *et al* (2013), se sabe que el estrés crónico por RES modifica en el ratón la expresión de genes hipotalámicos relacionados con el control del peso. Por ejemplo, reduce los niveles de RNAm de grelina y eleva los de POMC. Esto sugiere que en situaciones de estrés se favorece la expresión de péptidos anorexigénicos inhibiendo de esta forma el apetito y en consecuencia presentando un menor consumo de alimento y que el estrés modifica las vías que normalmente censan y responden a la reducción del peso. Sin

embargo, Kuri en el 2010 demuestra que el neuropéptido Y, secretagogo orexigénico, puede actuar junto o independiente de la ACh para regular la liberación de CA, importantes mediadores del estrés. Por lo tanto, las vías relacionadas al estrés, una vez activadas, actúan en oposición a los mecanismos que normalmente promoverían la recuperación del peso a niveles normales (Jeong *et al*, 2013).

Por otro lado, Hotchkiss y colaboradores (2004) plantean que la reducción en la ingesta de alimento puede deberse al rápido incremento en la CORT como respuesta al estrés ya que los glucocorticoides regulan diversos genes que participan en el metabolismo del organismo (Levine, 2005), incluyendo el de la leptina (Jeong *et al*, 2013).

3) Efecto del estrés por RES en los niveles de adrenalina y noradrenalina en la glándula adrenal.

Como se ha mencionado previamente, tanto la médula adrenal como el sistema simpático periférico son considerados como los tejidos responsables de la síntesis y liberación de CA, requeridas para la respuesta al estrés. A diferencia de la NA la A solo se sintetiza en la medula suprarrenal, de ahí que sus niveles séricos son buenos indicadores de la actividad glandular.

El objetivo principal de este trabajo fue probar la hipótesis de que la RES del movimiento por 2 horas en 5 días era suficiente para generar un modelo de estrés pseudocrónico en la cepa C57BL/6. El estrés se caracteriza por ser desencadenado por estímulos incontrolables e impredecibles. El modelo de estrés por restricción, después de varios días hay evidencia de que se va volviendo predecible y los animales se habitúan al mismo (Cruz *et al*, 2012; Pitman *et al*, 1988). Los resultados aquí presentados demuestran que el esquema utilizado afecta, de forma importante, el contenido de CA ya que disminuye el contenido total glandular de NA en 48.8% y del 51.76% en el caso de la A con respecto a los sujetos control, lo cual alcanzó significancia estadística (Fig. 30). Lo anterior es consistente con nuestra hipótesis de que el esquema de inmovilización utilizado es un modelo que genera estrés pseudocrónico.

No obstante, habría que descartar que en nuestras condiciones experimentales no ocurrió degradación de CA. Esto es improbable ya que las condiciones de luz y de

temperatura requeridas para determinación de CA fue la adecuada (Bicker *et al*, 2013) y se realizó con la supervisión de colaboradores con experiencia en determinación de aminas por HPLC. Más aún, nuestros resultados no lo indican ya que de haber ocurrido una degradación, ésta hubiese afectado por igual tanto la CA de los animales control como a los de estrés, grupos en los cuales detectamos cambios significativos en este parámetro.

Al realizar el análisis estadístico, encontramos que los niveles de NA y de A de la glándula adrenal de los ratones estresados son significativamente menores a los niveles de los ratones control. Este resultado es consistente con otro protocolo de estrés pseudocrónico realizado en ratas estresadas por exposición a frío (4°C por 5 días); ya que en este estudio encuentran una disminución en los niveles totales de ambas CA (Colomer *et al*, 2008).

También Kvetňansky y Mikulaj (1970), observaron una disminución del 15-20% en la adrenalina de la glándula adrenal de ratas sujetas a 90 minutos de IMO y un incremento en los niveles de la hormona en la orina, cuyo efecto duró 24 horas después del evento estresante, aunque no se encontró afectada la NA. No obstante, en modelos utilizando ratas en los cuales la IMO de 2.5 horas diarias se sostiene por nueve días, la A deja de estar disminuida e incluso el nivel de NA es mayor.

Esto sugiere que ante el estímulo persistente hay una adaptación de la médula adrenal, en la cual posiblemente aumenta la síntesis de CA a fin de compensar el incremento en su liberación y proveer de reservas al tejido, para una mejor secreción, ante estímulos intensos como una decapitación (Kvetňansky *et al*, 1985). Cabe mencionar, que en esta forma de sacrificio el nivel de CA plasmáticas en ratas estresadas por IMO aguda (150 min) puede incrementar hasta 12 veces en comparación a la cateterización.

Es importante considerar que la duración del estrés afecta de forma distinta la síntesis y liberación de catecolaminas. En modelos de IMO aguda (5-50 min), los niveles totales de catecolaminas en la glándula incrementan de 2 a 6 veces con respecto al control encontrándose un pico a los 30 min (Sánchez *et al*, 2003 y 2004); efecto contrario a lo encontrado en el presente trabajo en donde los niveles de NA y A de la glándula suprarrenal de los ratones control eran 2 veces mayores a los sometidos a RES de 5 días.

En las determinaciones por HPLC aquí reportadas, encontramos que los niveles de NA, tanto para ratones estresados como control son ligeramente mayores que los de A, 28% y 32%, respectivamente. Durante el estrés, aproximadamente el 95% de la A y una insignificante cantidad de NA (30% de la NA total circulante) se liberan de la médula adrenal, el 70% restante de NA se libera de las terminales de los nervios simpáticos (Kvetňanský *et al*, 2013). Esto podría explicar por qué la cantidad de A medida fue menor. Sin embargo, esto no es consistente con lo reportado en otros trabajos (Colomer *et al*, 2008; Sánchez *et al*, 2003 y 2004) en donde siempre los niveles totales glandulares de A son mayores que los de NA, independientemente de la situación de estrés. No obstante, esto podría ser comprobado midiendo los niveles plasmáticos de ambas hormonas, ya que aunque en general los niveles plasmáticos de NA son mayores que los de A, incluso durante el estrés, Goldstein y Kopin (2008) reportan que los niveles plasmáticos de A son mucho mayores a los de NA durante hipoglucemia, IMO y estresores emocionales, pero mucho menores durante exposición a frío o ante el dolor.

Así mismo, en la interpretación de los resultados hay que tomar en cuenta el tipo de sacrificio empleado ya que la decapitación, método utilizado en el presente estudio, ocasiona un aumento de hasta 80 veces en la A plasmática y solo un aumento de 8 veces en la NA (Kvetnansky *et al*, 1978).

IX. CONCLUSIONES

Se concluye que el estrés por RES de 2 horas diarias por 5 días es capaz de generar una respuesta al estrés ya que disminuyó en 49% y 52% el contenido total de NA y A, respectivamente, en la médula suprarrenal del ratón. Lo anterior apoya la hipótesis de que este modelo genera una disminución en el contenido de CA adrenales. Estudios actuales de otra alumna del laboratorio de la Dra. Pérez Armendariz están dirigidos a demostrar este aspecto mediante su determinación en suero.

Así mismo, la RES pseudocrónica generó un incremento en la ingesta de agua en los sujetos estresados, en comparación a los controles, durante el periodo de experimentación con respecto al de adaptación. Esto posiblemente resultó debido al aumento en la

temperatura y el consecuente aumento en la sudoración que sufrieron durante el experimento.

La RES del movimiento de 2 horas diarias durante 5 días no ocasionó cambios en el peso de los ratones en estudio al compararlos con los animales control. Además, no ocasionó cambios en la ingesta de alimento en los ratones de experimentación al compararlos con los ratones control, sugiriendo que el estrés pseudocrónico aplicado no llega a afectar los centros hipotalámicos del control alimentario.

Finalmente, cabe mencionar que la presente investigación es importante pues nos permite entender el impacto del estrés en el organismo, cuestión de gran relevancia en la actualidad debido a que varios estudios estadísticos han mostrado que la prevalencia de trastornos mentales aumentará de manera significativa en los próximos 20 años, siendo la depresión la segunda causa más frecuente de pérdida de la calidad de vida a escala mundial y la primera en países desarrollados. Asimismo, además de los trastornos mentales, se sabe que el estrés está relacionado con el desarrollo de padecimientos crónicos como la diabetes, enfermedades cardiovasculares y el cáncer que son responsables de más del 60% de las muertes en el mundo.

X. PERSPECTIVAS

- Se medirán las CA así como el cortisol sérico en el mismo modelo a fin de confirmar nuestra conclusión de que hay cambios en las CA séricas.
- Se obtendrán glándulas en otro grupo de animales experimentales y se analizarán los cambios en enzimas que participan en la síntesis de CA (PNMT, TH), por PCR en tiempo real en colaboración con otra alumna que se ha incorporado al proyecto.
- De sustentarse el modelo de estrés, este podrá ser utilizado para analizar los mecanismos involucrados en la respuesta al mismo.

XI. REFERENCIAS

1. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K y Walter, P. 2008. *Molecular Biology of The Cell*. 5a ed. Edit. Garland Science. USA. Pp. 1268.
2. Baker, P. y Knight, D. 1985. Calcium Control of Catecholamine Secretion in Bovine Adrenal Medullary Cells. En: *Catecholamines as hormone regulators*. Vol. 18 Edit. Raven Press. Rome, Italy. pp. 189-213.
3. Berenzon, S., Asunción, M., Robles, R. y Medina, M. 2012. Depresión: estado del conocimiento y la necesidad de políticas públicas y planes de acción en México. *Salud pública de México*. Vol. 55, N° 1.
4. Bicker, J., Fortuna, A., Alves, G. y Falcão, A. 2013. Liquid chromatographic methods for the quantification of catecholamines and their metabolites in several biological samples- A review. *Analytica Chimica Acta*. 768: 12-34.
5. Boletín de Información Clínica Terapéutica de la Academia Nacional de Medicina. 2012. El trastorno de ansiedad generalizada. 21(3):1-2.
6. Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254.
7. Brinks, V., van der Mark, M., de Kloet, R. y Oitzl, M. 2007. Emotion and cognition in high and low stress sensitive mouse strains: a combined neuroendocrine and behavioral study in BALB/c and C57BL/6J mice. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*. Vol. 1, Art. 8.
8. Buynitsky, T. y Mostofsky, D. 2009. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 33: 1089-1098.
9. Chourbaji, S., Brandwein, C., Vogt, M., Dormann, C. y Gass, P. 2008. Evaluation of effects of previous exposure to an acute stress before testing for depression-like behaviours in mice. *Stress*. 11 (2): 170-175.
10. Colomer, C., Desarménien, M. y Guérineau, N. 2009. Revisiting the stimulus-secretion coupling in the adrenal medulla: Role of gap junction-mediated intercellular communication. *Molecular Neurobiology*. 40:87-100
11. Colomer, C., Olivos, L., Coutry, N., Mathieu, M., Arthaud, S., Fontanaud, P., Iankova, I., Macari, F., Thouënnon, E., Yon, L., Anouar, Y. y Guérineau, N. 2008. Functional remodeling of gap junction-mediated electrical communication between adrenal chromaffin cells in stressed rats. *The Journal of Neuroscience*. 28 (26): 6616-6626.

12. Cruz, F., Marin, M., Leao, R. y Planeta, C. 2012. Behavioral and neuroendocrine effects of the exposure to chronic restraint or variable stress in early adolescent rats. *International Journal of Developmental Neuroscience*. 30: 19-23.
13. Debuse, S. 2004. Lo esencial en sistema endócrino y aparato reproductor, 2ª ed. Elsevier. España. pp. 41-55.
14. Dorantes, A., Martínez, C. y Guzmán, A. 2012. Endocrinología Clínica. 4ª ed. Edit. El Manual Moderno. México. Pp. 850.
15. Eagle Bioscience. Adrenaline (Epinephrine) High Sensitive ELISA Assay Kit. Pp. 14.
16. Eisenhofer, G., Kopin, I. y Goldstein, D. 2004. Catecholamine metabolism: A contemporary view with implications for physiology and medicine. *Pharmacological Reviews*. 56, 331–349.
17. Ganong, W. 2004. Fisiología Médica. 19ª edición. Edit. El Manual Moderno. México. Pp. 914
18. Gennaro, A. 2003. Farmacología. 20a ed. Vol. 1. Médica Panamericana. Buenos Aires. Pp 1408.
19. Goldstein, D. y Kopin, I. 2008. Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathoneural responses to stressors: A meta-analysis. *Endocrine Regulations*. 42, 111–119.
20. Grandin, T. y Deesing, M. 2003. Distress in Animals: Is it fear, pain or physical stress? Simposio: American Board of Veterinary Practitioners. Colecciones digitales de Colorado. Pp. 16
21. Guérineau, N., Desarménien, M., Carabelli, V. y Carbone, E. 2012. Functional chromaffin cell plasticity in response to stress: Focus on nicotinic, gap junction and voltage-gated Ca^{2+} channels. *Journal of Molecular Neuroscience, Special Issue on Chromaffin Cell Biology*. Versión 1. Pp 54.
22. Guyton, A. y J. Hall. 1997. Tratado de fisiología médica. 9ª ed. Edit. McGraw-Hill. Nueva York, México. Pp. 1262.
23. Harris, R., Palmondon, J., Leshin, S., Flatt, W. y Richard, D. 2006. Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. *Hormones and Behavior*. Vol. 49, Issue 5. Pp. 615-625.
24. Haycock, J. 1996. Short- and long- term regulation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells by VIP and PACAP. *Annals New York Academy of Sciences*. 805:219-30.
25. Herman, J. 2012. Neural pathways of stress integration, relevance to alcohol abuse. *Alcohol Research, Current Reviews*. 34(4):441-7.

26. Herman, J., Flak, J y Jankord, R. 2008. Chronic stress plasticity in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Prog Brain Res.* 170:353-364.
27. Hotchkiss, A., Pyter, L., Neigh, G. y Nelson, R. 2004. Nycthemeral differences in response to restraint stress in CD-1 and C57BL/6 mice. *Physiology & Behavior.* 80, 441–447.
28. Jankord, R. y Herman, J. 2008. Limbic regulation of Hypothalamo-Pituitary-Adrenocortical function during acute and chronic stress. *Ann N Y Acad Sci.* 1148:64-73.
29. Jeong, J., Lee, D. and Kang, S. 2013. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice. *Endocrinology and Metabolism.* 28:288-296.
30. Jöels, M. y Baram, T. 2009. The neuro-symphony of stress. *Nature Reviews Neuroscience.* Vol. 10, 459-466
31. Kacsoh, B., 2000. Endocrine Physiology. Edit. McGraw Hill. USA. pp. 360-447.
32. Koolhaas, J., Bartolomucci, A., Buwalda, B., de Boer, S., Flügge, G., Korte, S., Meerlo, P., Murison, R., Olivier, B., Palanza, P., Richter-Levin, G., Sgoifo, A., Steimer, T., Stiedl, O., van Dijk, G., Wöhr, M. y Fuchs, E. 2011. Stress revisited: A critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews.* 35: 1291–1301.
33. Kopin, I. 1985. Biochemical evaluation of sympatho-adrenal medullary activity- an overview. En: Catecholamines as hormone regulators. Vol. 18 Edit. Raven Press. Rome, Italy. pp. 175-187.
34. Kopin, I. 1995. Definitions of stress and sympathetic neuronal responses. *Annals New York Academy of Sciences.* 771:19-30.
35. Kuri, B. 2010. Regulation of catecholamine release from the adrenal medulla under the physiological stress response (Tesis). Case Western Reserve University. Pp. 149.
36. Kvetňanský, R., Lu, X., Ziegler, M. 2013. Stress-triggered changes in peripheral catecholaminergic systems. *Advances in Pharmacology.* Vol. 68. pp. 359-397.
37. Kvetňanský, R. y L. Mikulaj. 1970. Adrenal and urinary catecholamines in rats during adaptation to repeated immobilization stress. *Endocrinology.* Vol. 87, Issue 4: 738.
38. Kvetňanský, R., Lake, C., Thoa, N., Torda, T. y Kopin, I. 1978. Effect of handling and forced immobilization on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine-beta-hydroxylase. *Endocrinology.* 103, 1868–1874.

39. Kvetňanský, R., Torda, T., Dominiak, P., Vigaš, M., Németh, Š y Groebecke, H. 1985. Stress induced changes in the adrenergic system. En: Catecholamines as hormone regulators. Vol. 18. Raven Press. Rome Italy. pp. 237-257
40. Kvetňanský, R., Weise, V. y Kopin, I. 1970. Elevation of adrenal tyrosine hydroxylase and phenylethanolamine-n-methyl transferase by repeated immobilization of rats. *Endocrinology*. 87: 744.
41. Le Moal, M. 2007. Historical approach and evolution of the stress concept: A personal account. *Psychoneuroendocrinology*. 32, S3–S9
42. Levine, S. y H. Ursin. 1991. What is Stress? En: Stress neurobiology and neuroendocrinology. Edit. Marcel Dekker, Inc. USA. pp. 3-21.
43. Levine, S. 2005. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*. 30: 939-946.
44. Livezey, G., Miller, J., Vogel, W. 1985. Plasma norepinephrine and corticosterone stress responses to restraint in individual male and female rats, and their correlations. *Neuroscience Letters*. 62: 51-56.
45. Martínez, H., Castro, F., Arrieta, A. y Bonilla, E. 2004. Actividad motora espontánea y catecolaminas en cerebro de ratones negros C57BL/6 y albinos tratados con manganeso. *Invest. Clín.* v.45 n.1 Maracaibo.
46. Medina, M., Borges, G., Lara, C., Ramos, L., Zambrano, J. y Fleiz, C. 2005. Prevalencia de sucesos violentos y de trastorno por estrés postraumático en la población mexicana. *Salud pública de México*. Vol. 47, N° 1
47. Moreau, D., Guiland, J., Noirot, P. y Malval, M. 1979. *Journal of Physiology*. (Paris). 75, 755.
48. Mustafa, T., Zhihong, S., Eiden, A., Weihe, E., Thistlethwaite, I. y Eiden, L. 2015. Impact of PACAP and PAC1 receptor deficiency on the neurochemical and behavioral effects of acute and chronic restraint stress in male C57BL/6 mice. *Stress, Early Online*. 1-11.
49. Nankova, B., Tank, A. y Sabban, E. 1999. Transient or sustained transcriptional activation of the genes encoding rat adrenomedullary catecholamine biosynthetic enzymes by different durations of immobilization stress. *Neuroscience*, 94, 803–808.
50. Nicholson, B. 2003. Gap junctions-from cell to molecule. *Journal of Cell Science*. 116: 4479-4481
51. Nikulina, E., Skrinskaya, J. and Popova, N. 1991. Role of genotype and dopamine receptors in behaviour of inbred mice in a forced swimming test. *Psychopharmacology* 105, 525-529.

52. Noble, J. y Bailey, M. 2009. Quantitation of Protein. *Methods in Enzymology*. Vol. 463 Chapter Eight. 73-95.
53. Núñez, L., De La Fuente, T., García, A. y García-Sancho, J. 1995. Differential Ca^{2+} responses of adrenergic and noradrenergic chromaffin cells to various secretagogues. *Am J Physiol*. 269(6 Pt 1):C1540-6.
54. Olivier, C., y Hernández, L. (compiladores) 2012. Perfil epidemiológico de la salud mental en México. Secretaría de Salud. Edit Progreso. México DF. Pp. 189.
55. Pérez-Álvarez, A. y Albillos, A. 2007. Key role of the nicotinic receptor in neurotransmitter exocytosis in human chromaffin cells. *Journal of Neurochemistry*. 103: 2281-2290.
56. Perlman, R. y Role, L. 1985. The coordinate control of catecholamine secretion, synthesis and reuptake in chromaffin cells. En: Catecholamines as hormone regulators. Vol. 18 Edit. Raven Press. Rome, Italy. pp. 216-221.
57. Pitman, D., Ottenweller, J. y Natelson, B. 1988. Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: chronic stress and habituation. *Physiology and Behavior*. Vol. 43, pp. 47-55.
58. Role, L., Leeman, S. y Perlman, R. 1981. Somatostatin and substance P inhibit catecholamine secretion from isolated cells of guinea-pig adrenal medulla. *Neuroscience*. Vol 6, Issue 9, 1813-1821.
59. Ruiz, A. 2008. Anatomía humana. 4a ed, 6a reimpression. Edit. Médica Panamericana. Buenos Aires. Pp. 888.
60. Sabban, E. y Kvetňanský, R. 2001. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: Dynamics of transcriptional events. *Trends in Neurosciences*. 24, 91–98.
61. Sánchez, A., Toledo-Pinto, E., Menezes, M. y Pereira, O. 2003. Changes in norepinephrine and epinephrine concentrations in adrenal gland of the rats submitted to acute immobilization stress. *Pharmacological Research*. 48: 607–613
62. Sánchez, A., Toledo-Pinto, E., Menezes, M. y Pereira O. 2004. A simple high-performance liquid chromatography assay for on-line determination of catecholamines in adrenal gland by direct injection on an ISRP column. *Pharmacological Research*. 50: 481–485.
63. Sapolsky, R. 2002. Endocrinology of the stress-response. En: Behavioral Endocrinology. 2a ed. A Bradford Book, MIT Press. USA. pp. 409-450.

64. Selye, H. y Heuser, G. 1956. Fifth annual report on stress. MD Publications Inc. New York, USA. pp. 26-30
65. Tabarin, A., Diz-Chaves, Y., Consoli, D., Monsaingeon, M., Bale, T., Culler, M., Datta, R., Drago, F., Vale, W., Koob, G., Zorrilla, E. y Contarino, A. 2007. Role of the corticotropin-releasing factor receptor type 2 in the control of food intake in mice: a meal pattern analysis. *Eur J Neurosci.* 26 (8): 2303-2314.
66. Tai, T., Claycomb, R., Siddall, B., Ann Bell, R., Kvetnansky, R. y Wong, D. 2007. Stress-induced changes in epinephrine expression in the adrenal medulla in vivo. *Journal of Neurochemistry.* 101: 1108-1118
67. Tizabi, Y., Kopin, I., Maengwyn-Davis, G. y Thoa, N. 1976. *Psychopharmacol. Commun.* 2, 391.
68. Tortora, G. y Derrickson, B. 2006. Principios de anatomía y fisiología. Edit. Médica Panamericana, 11ª edición.
69. Tsunoda, M., Takezawa, K., Teruyuki, Y., Kato, M. y Imai, K. 2001. Determination of catecholamines and their 3-O-methyl metabolites in mouse plasma. *Biomedical Chromatography.* 15:41-44.
70. Ulrich-Lai, Y. y Herman, J. 2009. Neural regulation of endocrine and autonomic stress responses. *Nat Rev Neurosci.* 10(6): 397-409.
71. Van Bogaert, M., Groenink, L., Oosting, R., Westphal, K., Van der Gugten, J. and Oliver, B., 2006. Mouse strain differences in autonomic responses to stress. *Genes Braine Behaviour.* 5(2):139-49
72. Vogel, W. and Jensh, R. 1988. Chronic stress and plasma catecholamine and corticosterone levels in male rats. *Neurosci Lett.* 22; 87(1-2):183-8.
73. Weiner, H. 1991. Behavioral biology of stress and psychosomatic medicine. En: Stress neurobiology and neuroendocrinology. Edit. Marcel Dekker, Inc. USA. pp. 23-51.
74. Wong, D. y Tank, W. 2007. Stress-induced catecholaminergic function: Transcriptional and post-transcriptional control. *Stress.* 10(2): 121-130.