



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

CARRERA DE QUÍMICO FARMACÉUTICO
BIOLÓGICA

**“Análisis de la presencia y segregación de
Acetilcolina y GABA en Ganglio Cervical Superior
de ratas espontáneamente hipertensas (SHR)”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

FILIBERTO MIGUEL ZÚÑIGA

DR. MIGUEL ÁNGEL MORALES MENDOZA
DIRECTOR

DR. OSVALDO GARRIDO ACOSTA
ASESOR
CIUDAD DE MÉXICO
2016





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se desarrolló en el Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM; se realizó con apoyo otorgado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el registro 236903.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, el Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza por la asesoría, apoyo, por sus magistrales enseñanzas así como la confianza para aceptarme dentro de sus proyectos de investigación para poder realizar esta tesis.

Al Dr. Fredy Cifuentes por su asesoría, colaboración y consejos que me brindó durante el desarrollo del proyecto.

A Diana Elinos por su amistad y el poder compartirme sus conocimientos, así como la tolerancia que tuvo al asesorarme para incluirme al grupo de trabajo.

Al M. en C. Luis Martínez Zaldívar por su apoyo y en especial énfasis por los datos otorgados de las curvas de entrada/salida (I/O).

A la QFB Ma. Elena Zetina Rosales, por el excelente soporte técnico y su tolerancia en mi aprendizaje.

Al técnico Pedro Medina por su excelente ayuda, tolerancia y sus enseñanzas en la aplicación de técnicas en el laboratorio.

A la Dra. Ángeles Cancino por sus consejos y enseñanzas.

A todos mis compañeros del laboratorio: Rommel, Manuel, Jessica, Luis, Diana y Carlos; por proporcionarme ayuda, por compartirme sus conocimientos prácticos/teóricos y por su valiosa amistad.

Agradezco a mi asesor interno por sus acertados consejos y el valioso tiempo que dedicó para apoyarme en la culminación del trabajo.

Dr. Osvaldo Garrido Acosta

A los miembros de mi comité sinodal por su tiempo y atención.

M. en C. María Teresa Griselda Fuentes Lara

Q.F.B. Miriam Hinojosa Morales

Dra. Juana Rosado Pérez

DEDICATORIAS

A Margarita Miguel Trinidad; por su ayuda y cariño, por su apoyo incondicional y quien desde que fui niño se ha propuesto enseñarme y darme lo mejor; infinitas gracias.

A Teiti y Male.

A mi abuela, mis padres y hermanos, sin ellos mi vida apenas sería una absurda existencia.

A mis tías; Esperanza y Luciana por su tolerancia, comprensión y enseñanzas.

A todos mis amigos de Jaltepec y de la Universidad; quienes han sido necesarios y son un lugar seguro y cálido contra las bestias del olvido.

ÍNDICE

ÍNDICE	i
ABREVIATURAS	iii
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
1. Sistema nervioso.....	3
1.1. Sistema nervioso autónomo.....	3
1.2. Sistema nervioso simpático.....	4
1.3. Ganglio cervical superior	4
2. Neurotransmisión	6
2.1. Breve contexto histórico.....	7
2.2. Co-transmisión	7
3. Segregación.....	8
3.1. Co-transmisión y segregación en las neuronas simpáticas.....	9
3.2. Neurotransmisión por GABA.....	9
3.3. Plasticidad de la segregación y expresión de neurotransmisores.....	10
4. Hipertensión arterial esencial.....	10
4.1. Generalidades	10
4.2. Hiperactividad simpática en hipertensión.....	11
4.3. Rata espontáneamente hipertensa	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	15
Objetivo general.....	15
Objetivos particulares	15
MATERIAL Y MÉTODOS.....	16
1. Diseño experimental.....	16
2. Tablas	17

2.1 Instrumentos y equipo	17
2.2 Reactivos y Farmacología	17
2.3 Anticuerpos	18
3. Material biológico	19
4. Medición de la hipertensión.....	19
5. Estudio de expresión y segregación de neurotransmisores	20
5.1. Perfusión y disección del GCS	20
5.2. Inmunofluorescencia	20
5.3. Captura y análisis de imágenes.....	21
6. Curvas estímulo/respuesta (input/output; I/O).....	22
7. Análisis estadístico	23
RESULTADOS	24
1.- Presencia de neuronas preganglionares simpáticas GABAérgicas y colinérgicas en las astas intermediolaterales de la médula espinal.....	24
2. Segregación de ACh y GABA	25
Tabla 1. Resultados de segregación de GABA y ACh en GCS	25
3.- Expresión y distribución total y regional de GABA y ACh	28
Tabla 2. Expresión y distribución de GABA y ACh en GCS	28
4. Curvas estímulo/respuesta.....	30
DISCUSIÓN.....	32
CONCLUSIONES.....	35
PERSPECTIVAS	36
REFERENCIAS	37
APÉNDICES.....	45
1. Ejemplo de análisis de segregación.	45
2. Cartel presentado en el LVIII Congreso Nacional De la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.	46

ABREVIATURAS

ACh- Acetilcolina

AChT- Transferasa de Acetilcolina

GABA- Ácido γ -aminobutírico

GAD- Glutamato descarboxilasa

GCS- Ganglio cervical superior

GLUT- Glutamato

HTA- Hipertensión arterial

IML- Intermediolateral

NA- Noradrenalina

NCE- Nervio carotídeo externo

NCI- Nervio carotídeo interno

PA- Presión arterial

SHR- Rata espontáneamente hipertensa

SN- Sistema nervioso

SNA- Sistema nervioso autónomo

SNC- Sistema nervioso central

SNP- Sistema nervioso parasimpático

SNS- Sistema nervioso simpático

SPN- Neuronas preganglionares simpáticas

VAcHT- Transportador vesicular de acetilcolina

WKy- Rata Wistar Kyoto

INTRODUCCIÓN

El relevo de información en el sistema nervioso se lleva a cabo entre neuronas mediante sitios especializados llamados sinapsis. En el sistema nervioso simpático (SNS) las sinapsis son de carácter químico y hay evidencias de que las neuronas individualmente son capaces de usar más de un mensajero químico para transmitir sus señales, lo que se conoce como co-transmisión. El almacenamiento y liberación de dos o más neurotransmisores en las terminales nerviosas de las neuronas puede lograrse al menos de dos maneras: por almacenamiento y liberación de la misma combinación de transmisores en todas las terminales o almacenar y liberar cada uno en terminales específicas (segregarlos). Actualmente es más aceptada la primera opción, sin embargo, desde la década de los 90's se han acumulado evidencias que apoyan la segregación. Resultados previos a este proyecto han demostrado la segregación de dos transmisores clásicos, el ácido γ -aminobutírico (GABA) y la acetilcolina (ACh), en las terminales de las neuronas preganglionares simpáticas. También se ha evidenciado que la segregación y expresión de neurotransmisores es una característica plástica que puede ser modulada in vitro e in vivo por cambios en el entorno sináptico.

Con el conocimiento del potencial plástico de las neuronas simpáticas, en este proyecto investigamos si cambios fisiopatológicos, como puede ser el incremento de la estimulación simpática que subyace a la hipertensión arterial puede también afectar la presencia y segregación de neurotransmisores. Comparamos la presencia y segregación de los marcadores GABAérgicos y colinérgicos; la enzima glutamato descarboxilasa 67 (GAD67) y el transportador vesicular de ACh (VAChT), en ganglio cervical superior (GCS) de ratas control Wistar-Kyoto (WKy) y de ratas espontáneamente hipertensas (SHR). Los GCS de ratas macho SHR y WKy de 12 semanas (250-300 g) fueron procesados con técnicas de inmunofluorescencia para detectar la presencia de GAD67 y VAChT. Las preparaciones se observaron y digitalizaron mediante microscopía confocal para posteriormente ser analizadas con software de procesamiento de imágenes. Para

observar una posible correlación funcional con los cambios morfológicos se realizaron curvas estímulo/respuesta (I/O) registrando y grabando la respuesta amplificada de los potenciales de acción compuestos (PAC) del GCS al aumentar gradualmente el voltaje de los pulsos enviados por un estimulador hasta alcanzar la respuesta supramáxima.

La actividad simpática aumentada que subyace la HTA pudiera ser el resultado de una disminución de la presencia de GABA (neurotransmisor de tipo inhibidor) o de un aumento de ACh (estimulante).

MARCO TEÓRICO

1. Sistema nervioso

El sistema nervioso anatómicamente se divide en dos partes: El sistema nervioso central (SNC); componente alojado dentro del conducto óseo craneorraquídeo y al componente que emana fuera del conducto se denomina sistema nervioso periférico. Así también visto con una perspectiva funcional puede dividirse como sistema nervioso somático o voluntario y el sistema nervioso autónomo o vegetativo (SNA).¹

1.1. Sistema nervioso autónomo

El SNA tiene una actividad sostenida que le permite coordinar, regular e integrar diferentes sistemas (cardiovascular, respiratorio, urinario, reproductor, gastrointestinal etc.) lo cual permite una adecuada homeostasis corporal. El SNA al integrar información de estímulos somatosensoriales desencadena mecanismos de respuesta para elevar o disminuir la actividad en un momento determinado pudiendo generar cambios rápidos en la actividad de algunos órganos por ejemplo para generar respuestas rápidas al estrés. Para poder ejercer este control el SNA requiere integrar la información ambiental y fisiológica y coordinar el SNC y el sistema nervioso periférico. Los principales componentes periféricos del SNA considerando anatomía, fisiología y farmacología son el sistema nervioso simpático (SNS) o adrenérgico que incluye la médula adrenal y el sistema nervioso parasimpático (SNP) de carácter colinérgico, estos a su vez generalmente tienen funciones antagónicas en el mismo órgano o tejido.^{1,2}

El principal centro que integra la información del SNA es el hipotálamo, la vía simpática es regulada en mayor proporción por el núcleo posterolateral y el control de la vía parasimpática se encuentra en los núcleos del hipotálamo medial y anterior. Las amígdalas cerebelosas y el tronco encefálico son los encargados de generar respuestas rápidas integrando la información de las vías aferentes y

eferentes por ejemplo como sucede con los ajustes hemodinámicos momentáneos.²

1.2. Sistema nervioso simpático

Las vías eferentes del SNS son críticas para mantener la presión arterial, la termorregulación y redistribuir el flujo sanguíneo regional durante un periodo de estrés o ejercicio. Los principales nervios que componen el SNS anatómicamente tienen su origen en las neuronas llamadas preganglionares que se encuentran en las astas intermediolaterales (IML) entre los segmentos cervical 8 y lumbar 2 de la médula espinal (con pocas variaciones), y estas neuronas reciben eferencias de neuronas premotoras que se encuentran en el tallo cerebral o en el hipotálamo.²

Las eferencias nerviosas que salen de los cuerpos celulares de la médula son llamadas fibras preganglionares y se comunican con neuronas que residen en 23 pares de ganglios bilaterales a la columna vertebral. En estos ganglios, los axones preganglionares hacen sinápsis con las neuronas ganglionares (última neurona simpática de la vía eferente). Finalmente la inervación llega al órgano blanco a través de los nervios postganglionares. Los blancos de las neuronas simpáticas ganglionares incluyen: músculo liso y cardíaco, estructuras glandulares y órganos parenquimales así como componentes cutáneos.^{1, 3}

1.3. Ganglio cervical superior

El ganglio cervical superior (GCS) es uno de los principales componentes de la cadena de ganglios que componen el SNS. Es el primero de los 3 ganglios cervicales y se encuentra en posición rostral a la bifurcación de la arteria carótida interna. Las neuronas que se encuentran en el GCS reciben inervación principalmente de las neuronas que se encuentran en los segmentos espinales torácicos 1 a 3. La población de neuronas ganglionares son una mezcla de fenotipos químicos un tanto distintos e inervan tejidos u órganos como lechos vasculares en el cerebro y músculo, también componentes de la piel y glándulas como sistemas piloerectores o glándulas salivales, esta inervación se da a través de las fibras postganglionares que abandonan el ganglio a través de 2 vías de salida: el nervio carotídeo interno y el carotídeo externo (NCI, NCE).^{1, 4, 5} Se han

mostrado evidencias que sugieren que las eferencias que abandonan vía NCE provienen mayormente del área caudal y las fibras nerviosas que salen por el NCI provienen de la población celular que se encuentra en el área rostral.⁶

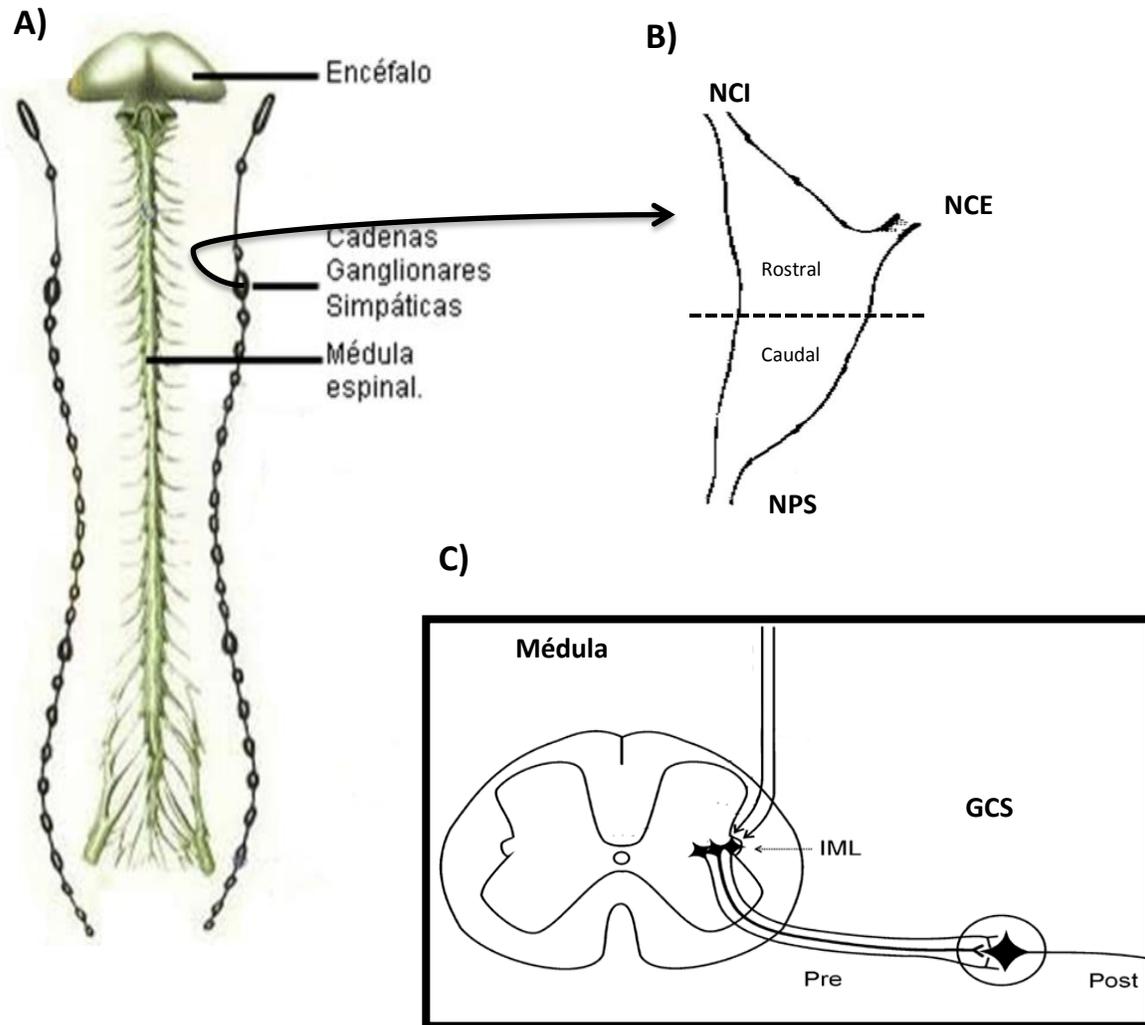
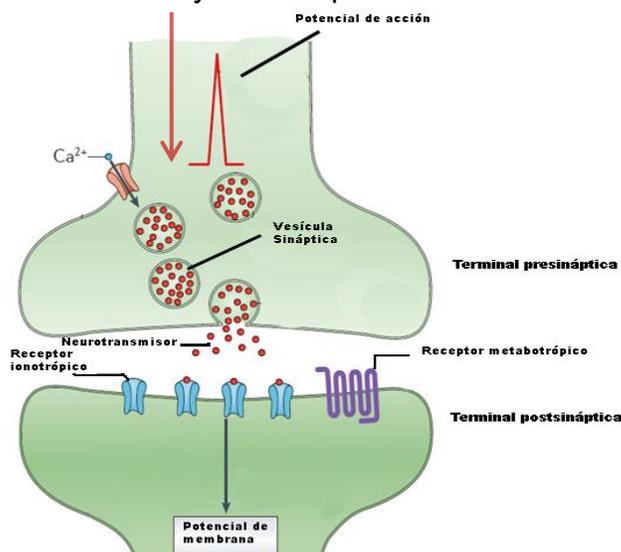


Figura 1. Se muestra el esquema general de cómo está conformado el SNS. A) Se muestra la anatomía general del SNS; la cadena bilateral simpática a lado de la médula espinal. B) Una ampliación del GCS y sus dos principales vías de salida de información, así como la entrada de eferencias a través del nervio preganglionar simpático (NPS). C) Se esquematiza como se está llevando a cabo el relevo de información entre las SPN que se encuentran en el núcleo IML de la médula (corte transversal) y el GCS.

2. Neurotransmisión

La información en el sistema nervioso se transmite a través de impulsos nerviosos a lo largo de las neuronas y entre ellas en sus zonas especializadas de aproximación conocidas como sinapsis.⁷ Existen dos modalidades de sinapsis, las de tipo químico y las eléctricas. Las sinapsis eléctricas se rigen por la transferencia de señales intracelulares entre dos neuronas por medio de uniones especializadas llamadas uniones comunicantes (gap junction por sus siglas en inglés),^{8,9} mientras que por otra parte en la comunicación de carácter químico una neurona transmite información liberando moléculas (neurotransmisores) hacia la siguiente neurona a través del espacio sináptico.

El mecanismo general de la transmisión química es el siguiente: al llegar el impulso nervioso a las terminales nerviosas hay una entrada de Ca^{2+} desde el espacio intersticial hacia el citoplasma, esto genera una cascada de vías de señalización, que de manera general promueven la movilización de las vesículas que contienen los neurotransmisores hacia la membrana de la terminal presináptica y se fusionan con esta para poder liberar las moléculas químicas hacia el espacio extracelular, el neurotransmisor interactúa entonces con un receptor específico en la membrana de la célula postsináptica. Esta interacción provoca la activación de una vía celular inhibitoria o excitatoria dependiendo del neurotransmisor y del receptor en cuestión.^{10,11.}



Modificado de Ref. 12

Figura 2. Esquema que presenta la estructura sináptica y como se lleva a cabo la transmisión química.

La flecha roja marca la llegada del potencial de acción. Los puntos rojos son la representación de los neurotransmisores moviéndose dentro de las vesículas hacia la membrana. Se muestran en azul y morado los posibles receptores a los que se unen los neurotransmisores para generar cambios en las propiedades de la terminal postsináptica.

2.1. Breve contexto histórico

Después de aceptarse la noción de que las neuronas se podían comunicar a través de las sinapsis por medio de la liberación de neurotransmisores,¹³ Henry Dale en 1935 sugirió que cada neurona se comportaba como una unidad metabólica, la cual incluía el cuerpo celular y todos sus procesos, así pues todas sus sinapsis deberían de operar con la misma señal química. En 1954 esta hipótesis fue interpretada por J. Eccles de que las neuronas eran capaces de liberar solo un neurotransmisor en todas sus terminales sinápticas y acuñada como Principio de Dale.^{14, 15}

Con el avance de las técnicas en la ciencia como la microscopía electrónica, la fluorescencia inducida y la electrofisiología, en los años 60's se refutó esta propuesta de una "neurona un transmisor" ya que se encontró que las neuronas almacenaban y liberaban más de un transmisor.

2.2. Co-transmisión

A la propiedad de las neuronas de poder operar con al menos dos neurotransmisores se le llamó co-transmisión sináptica.¹⁶⁻¹⁸ En la co-transmisión participan al menos dos tipos de transmisores:¹⁷ el neurotransmisor principal (clásico); que a través de modificar las propiedades eléctricas de la membrana postsináptica transmite o inhibe el impulso nervioso y los co-transmisores que por sí solos no modifican la polaridad membranal y se encargan de modular la señal generada por el transmisor clásico, generalmente son neuropéptidos y están relacionados a receptores metabotrópicos.¹⁹⁻²¹

Aunado al descubrimiento de los neuropéptidos como co-transmisores, se ha encontrado también la co-existencia y co-transmisión entre dos neurotransmisores clásicos.^{22, 23} Lo anterior sugiere que cuando una neurona puede ser capaz de operar con dos neurotransmisores clásicos distintos enriquece sus posibilidades de comunicación sináptica, pudiendo generar variados patrones de respuesta postsináptica como el caso de las células granulares del bulbo olfatorio las cuáles son de carácter GABAérgico pero pueden liberar glutamato (GLUT) en sus procesos.²⁴

3. Segregación

El uso de más de un neurotransmisor distinto por una misma neurona; de manera general sugiere dos posibles patrones morfológicos de su liberación:²⁵

1.- Que el mismo juego de neurotransmisores con que opere la neurona sea almacenado y liberado en todas sus sinapsis. Esta propuesta constituye el Principio modificado de Dale.

2.- Que puedan ser segregados, es decir, que puedan ser enviados diferencialmente a terminales específicas.

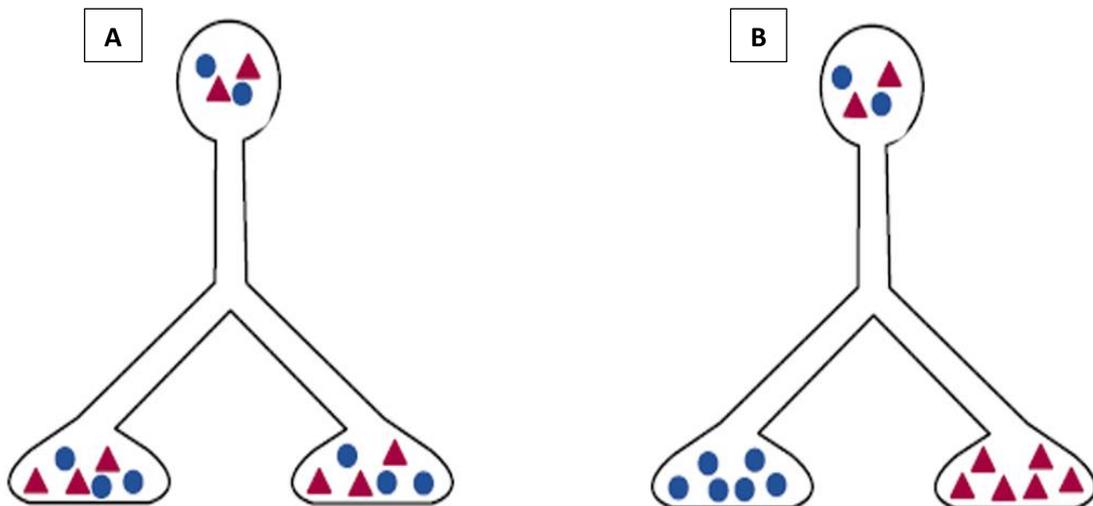


Figura 3. Esquema del Principio Moderno de Dale contrastando con la Segregación.

En la figura A los neurotransmisores (círculos azules y triángulos rojos) son sintetizados en el soma y enviados de igual manera hacia todas sus terminales. En la figura B se observa que estos pueden ser enviados diferencialmente a terminales distintas (segregados).

Lo comúnmente aceptado es el caso de la figura 3A, sin embargo se empezaron a mostrar evidencias que incluyen el caso de la figura 3B. Una de estas primeras evidencias fue presentada en 1990 por Sossin y colaboradores en sus trabajos en el molusco *aplysia californica* donde mostraron que las neuronas no siempre

liberan el mismo juego de neurotransmisores en todas sus terminales sinápticas.²⁶
²⁷ Evidencias más recientes muestran el fenómeno en el sistema nervioso central de vertebrados, por ejemplo entre GLUT y dopamina en neuronas dopaminérgicas del área ventral del mesencéfalo y en el sistema nervioso periférico entre GLUT y ACh en las neuronas motoras.^{28, 29}

3.1. Co-transmisión y segregación en las neuronas simpáticas

Se ha encontrado la segregación del transmisor clásico ACh con diversos péptidos co-transmisores^{30,31} así como con otros transmisores clásicos, con la noradrenalina (NA) en las neuronas ganglionares simpáticas y con el ácido γ -aminobutírico (GABA) en las preganglionares.^{32, 33} Al detectarse la segregación de ACh y GABA en el GCS se encontró un patrón heterogéneo de distribución regional tanto en la expresión de GABA como de su segregación con ACh; mientras que el GABA se expresa con un gradiente rostro-caudal, la segregación sigue el gradiente opuesto, caudo-rostral. Estos datos de distribución heterogénea llevaron a considerar la posibilidad de que la segregación de transmisores, dependiendo de su nivel de presencia y de su regionalización pudiera influir de diferente manera en la transmisión y regulación simpática.^{32, 34}

3.2. Neurotransmisión por GABA

GABA es el neurotransmisor inhibitorio más abundante en el SN; es sintetizado a partir del ácido glutámico mediante la acción de las enzimas ácido glutámico descarboxilasa 65 y 67 y es transportado al interior de las vesículas por un transportador vesicular (VGAT).^{35, 36} En el SNS GABA está tanto en los somas de las neuronas preganglionares que se encuentran en la médula como en sus respectivas terminales dentro del GCS. GABA tiene una acción despolarizante en neuronas postganglionares que es acompañada por una depresión en la transmisión nerviosa.³⁷ Esto es debido a que GABA al unirse a su receptor GABA_A permite la salida de iones cloruro (Cl⁻), entonces la membrana sufre una despolarización, de un potencial de membrana en reposo de -70mV a -45mV y ahí se mantiene sin poder alcanzar el umbral (-40mV) para poder producir un potencial de acción.³⁷ Por otra parte también se ha descrito que GABA en el GCS

al interactuar con su receptor en la región presináptica inhibe la liberación de ACh.³⁸

Conociendo las actividades de GABA podría suponerse que mayor segregación (mayor cantidad de terminales con solo GABA) en la región caudal del GCS implique que el GABA se almacene y libere mayoritariamente de manera independiente de ACh, lo que implicaría menor modulación directa sobre la transmisión colinérgica. Lo opuesto sucedería en la región rostral donde la co-existencia mayoritaria de ACh y GABA resultaría en una co-liberación que induciría una constante y posiblemente mayor modulación (inhibición) de GABA sobre la acción colinérgica. Además se ha encontrado que GABA inhibe más la transmisión ganglionar en las neuronas rostrales que las caudales.³³

3.3. Plasticidad de la segregación y expresión de neurotransmisores.

Se ha demostrado que la segregación y expresión de transmisores en las terminales neuronales preganglionares no es invariable sino que puede ser influido por el entorno sináptico, tanto en neuronas ganglionares en cultivos como en tejidos íntegros. En ambas condiciones cambios en la presencia de neurotrofinas en el medio modifica los niveles de segregación y presencia de neurotransmisores.^{32, 39}

4. Hipertensión arterial esencial

4.1. Generalidades

La presión arterial (PA) es la medida de la fuerza que ejerce la sangre contra las paredes vasculares.⁴⁰ La hipertensión arterial esencial (HTA) es una enfermedad progresiva y crónica que afecta alrededor del 26% de la población mundial⁴¹ y consiste en un aumento sostenido de la presión arterial (>140 mmHg PA sistólica, >90 mmHg PA diastólica). Alrededor del 90% de los casos no tiene una causa identificable y se considera que es generada por una interacción entre factores genéticos y ambientales.⁴²

4.2. Hiperactividad simpática en hipertensión

Se ha documentado que el SNA juega un papel muy importante modulando funciones cardiovasculares y controlando los valores de la PA. Varios estudios sugieren que la progresión y el establecimiento de la HTA están relacionados con una disfunción autonómica cardiovascular, en especial una hiperactivación del SNS.^{43, 44}

Dentro de la hiperactividad del SNS se encuentra: Niveles incrementados en la liberación de NA y adrenalina, una actividad incrementada de actividad nerviosa simpática en músculo liso y cardíaco, el aumento del ritmo cardíaco por estimulación simpática, además se ha evidenciado que el resultado de una simpatectomía reduce la presión arterial y su evolución a hipertensión.⁴⁵⁻⁴⁷

4.3. Rata espontáneamente hipertensa

La rata espontáneamente hipertensa o SHR por las siglas en inglés (Spontaneously Hypertensive Rat) es un modelo animal de hipertensión que se desarrolló en 1963 en la Universidad de Kyoto mediante la cruce endogámica de ratas que presentaban hipertensión y subsecuentemente se desarrolló de manera similar en 1971 el control normotenso, las ratas Wistar Kyoto (WKy).⁴⁸

Las SHR son ratas albinas que a partir de la tercer semana de edad su PA empieza aumentar, después de las 10 semanas ya alcanzan alrededor de los 150 mm Hg y alcanzan valores máximos (>180 mm Hg) con una estabilización a las 12 semanas de edad. Las ratas WKy y SHR son un buen modelo para estudiar la HTA ya que presenta varias similitudes con la enfermedad que se presenta en los seres humanos: tiene un posible origen poligénico, los niveles plasmáticos de catecolaminas están elevados por posible alteración simpática, la PA aumenta con la edad, hay complicaciones similares como por ejemplo hemorragias cerebrales, deterioro de la función renal e hipertrofias ventriculares. También en la SHR hay una respuesta farmacológica similar a antihipertensivos de uso humano como la reserpina. Antes de la tercera semana su PA es de 120-80 mmHg (presión sistólica-diastólica respectivamente).^{48, 49}

Dada la estrecha relación del SNS y la HTA, sería de esperarse que haya una diferencia en la transmisión nerviosa y en los patrones morfológicos de los neurotransmisores del GCS, esto debido a las alteraciones simpáticas que subyacen en la HTA en el modelo SHR respecto a la rata WKy.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Considerando que la segregación y la expresión de neurotransmisores en el GCS muestran patrones heterogéneos topográficos y que tanto la expresión como la segregación son una característica plástica, es decir que son regulables por factores del entorno celular, nos preguntamos si los cambios encontrados en un proceso fisiopatológico conllevaría cambios en la distribución expresión y niveles de segregación de transmisores clásicos antagónicos como GABA y ACh en el SNS.

Para abordar este problema seleccionamos un proceso fisiopatológico que involucrara alguna disfunción simpática como es la HTA que se sabe cursa con una hiperactividad simpática. Como modelo experimental de estudio se eligió el de SHR y su control normotenso la rata WKy.

HIPÓTESIS

Dado que hay una evidente hiperactividad simpática en el modelo SHR respecto al su control normotenso la rata WKy y considerando que la expresión y segregación de neurotransmisores es una característica plástica; la HTA modifica los patrones de expresión de GABA, así como los de su segregación con la ACh en el GCS de la SHR respecto a la rata normotensa WKy. También se espera una diferencia en la transmisión ganglionar entra ambas cepas de rat, cambio que pudiera estar relacionado con los cambios morfológicos que se encuentren en GABA y ACh.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Determinar si existen cambios en la segregación y expresión de los neurotransmisores GABA y ACh en GCS de SHR respecto a la WKy.

Objetivos particulares

- Determinar el patrón de segregación y expresión de neurotransmisores en el GCS de rata control normotensa WKy usando marcaje inmunofluorescente.

- Determinar el patrón de segregación y expresión de neurotransmisores en el GCS en el modelo de SHR usando marcaje inmunofluorescente.

- Determinar si los cambios morfológicos se relacionan con cambios funcionales del GCS.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Diseño experimental

- Tipo de estudio:

Se hará un estudio de carácter observacional, comparativo y retrospectivo de corte transversal.

- Población de estudio:

5 Ratas WKy y 5 SHR; machos de 12 semanas.

- Criterios:

Inclusión: Ratas WKy normotensas y SHR Hipertensas.

Exclusión: SHR no hipertensas, WKy hipertensas.

- Variables

Independiente: Tipo de cepa y edad de las ratas.

Dependiente: La expresión de GABA, los niveles de segregación de GABA con ACh, los parámetros de la respuesta ganglionar en las curvas I/O.

2. Tablas

2.1 Instrumentos y equipo

Instrumentos/equipo.	Marca
Micrótomo de congelación.	Leica CM1850
Microscopio confocal.	LSM 510 Pascal Zeiss
Microscopio epifluorescencia.	Nikon Eclipse E600
Estimulador	Pulsar 6i FHC
Amplificador	DP-301; Warner Instrument Corp.
Transductor de presión	P23 XL Grass Instruments.

2.2 Reactivos y Farmacología

Reactivos/Farmacología	Marca/catálogo
Resina p/criocortes TFM	Triangle Biomedical Sciences (TFM-5)
Líquido p/inmunomontaje	Dako (S3023)
p-formaldehído	Sigma-Aldrich (158127-500G)
Ácido pícrico	Spectrum Quality Products (P1145)
NaCl	J.T. Baker (3624-01)
KCl	J.T. Baker (3040-01)
KH ₂ PO ₄	J.T. Baker (3246-01)
MgCl ₂	Sigma-Aldrich (M-8266)
CaCl	J.T. Baker (1311)
NaHCO ₃	Merck Mollipore (106329)
Sacarosa	J.T. Baker (4072-01)
Suero albúmina bovina	Sigma-Aldrich (A-9647-50G)
Pentobarbital sódico	PISA (1016448)

Ketamina	PISA (1024314)
Xilazina	PISA (1016040)

2.3 Anticuerpos

Anticuerpo	Origen	Tipo	Fluorocromo.	Dilución	Marca/Catalogo
Primarios					
Anti-ChAT	Cabra	IgG/policlonal	---	1:200	Millipore AB144P-200uL
Anti-VACHT	Cabra	IgG/policlonal	---	1:200	Abcam ab27941
Anti-GAD67	Ratón	IgG/monoclonal	---	1:200	Millipore MAB5406
Secundarios					
Anti-cabra	Burro	IgG/policlonal	AlexaFluor 488	1:200	Jackson 705-545-003
Anti-ratón	Burro	IgG/policlonal	Dylight 594	1:600	Jackson 715-515-150

3. Material biológico

Se usaron 5 SHR con sus respectivos controles WKy, ambas cepas fueron machos de 12 semanas (200-250g).

Las ratas se obtuvieron del bioterio del Instituto de Fisiología Celular UNAM y se mantuvieron en cajas de acrílico transparente, con libre acceso de agua y alimento, a una temperatura de 24°C, humedad del 50% y ciclos luz/oscuridad, 12/12. El manejo de los animales se hizo de acuerdo a NOM-062-ZOO-1999 y guías internacionales de uso y cuidado de animales de laboratorio para la investigación, así como al Código Ético del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, y con la aprobación de la Comisión Institucional para el Cuidado y Uso de Animales del Laboratorio (CICUAL) del propio Instituto.

4. Medición de la hipertensión

Las ratas se anestesiaron con Xilazina (10mg/Kg) y Ketamina (90mg/Kg). Se les colocó una cánula previamente purgada con solución salina (NaCl 0.9%) heparinizada (40UI/mL) en la arteria femoral y se fijó a esta mediante 2 hilos de seda. Ya instalada la cánula se llenó en la punta con glucosa al 50% heparinizada (1500 UI/mL) y se les colocó un tapón de acero inoxidable en el extremo para evitar la fuga de sangre. Utilizando un catéter (punzocat, 14G x 2") introducido desde la nuca, la punta de las cánulas se pasó a la parte dorsal del animal; quedando expuesta la punta fuera de la piel. La rata se suturó y sobre la herida se aplicó un antiséptico tópico. Después de la recuperación del animal la punta de la cánula se conectó a un transductor de presión para censar las señales de la presión diastólica y sistólica mediante un sistema analógico/digital. Las señales fueron registradas durante 120 minutos a 24 y 48 horas y se hizo un promedio de todos los datos registrados.

5. Estudio de expresión y segregación de neurotransmisores

Para explorar si había cambios en la segregación y expresión de los neurotransmisores GABA y ACh en SHR y WKy se procesaron de la siguiente manera:

5.1. Perfusión y disección del GCS

Las ratas fueron anestesiadas profundamente con pentobarbital sódico (125 mg/kg.) y perfundidas con solución fijadora (paraformaldehído al 2% y ácido pícrico al 0.18% en PBS 0.1M, pH 7.4).

Se extrajo el GCS (ambos) y médula espinal del segmento C8 a T4, el GCS se pasó por una solución de crioprotección que consistió en sacarosa al 30% (la médula fue primero incluida en sacarosa 10% 12h después sacarosa 20% 12 h y finalmente sacarosa 30%). Los tejidos posteriormente se extrajeron de la solución de crioprotección y se incluyeron en resina para hacer cortes de 14 μm en un micrótopo de congelación a -20°C ; longitudinales en GCS y longitudinales y transversales en médula. Los cortes se recolectaron en portaobjetos cargados eléctricamente para retenerlos y poder ser procesados con técnicas de inmunofluorescencia.

5.2. Inmunofluorescencia

Los cortes fueron pre-incubados con albúmina de suero bovino (BSA) al 10% por 1h. Los cortes se procesaron usando anticuerpos primarios contra las enzimas transferasa de acetilcolina (ChAT), gama amino descarboxilasa 67 (GAD67) y el transportador vesicular de acetilcolina (VACHT). Para detectar marca con los anticuerpos ant-GAD67 fue necesario intensificar la antigenicidad a través de pasar los cortes en citratos. Los anticuerpos fueron diluidos en BSA 10%. Después de la incubación con anticuerpos primarios a los cortes se les hicieron 3 lavados de 10min c/u con PBS-Tritón X-100 (PBS 0.1M, Tritón X-100 0.3%) y se incubó por 2 hrs con anticuerpos secundarios acoplados a los fluoró cromos Alexa 488 y Dylight 594. Para evitar falsos positivos algunos cortes se procesaron con todos los pasos excepto la incubación con anticuerpos primarios. Después de los anticuerpos secundarios a los tejidos se les realizaron 3 lavados de 10 min. c/u

con PBS (0.1M) para posteriormente ser montados con medio especial para fluorescencia. Todas las incubaciones se realizaron en cámara de humedad. Para GCS se realizó inmunomarcaje doble usando GAD67/VChT y para médula GAD67/ChAT.

5.3. Captura y análisis de imágenes

Los cortes se observaron en un microscopio confocal (LSM 5 Pascal Zeiss) equipado con láser Argón/Kriptón en los filtros que correspondieran para las longitudes de onda de emisión/absorción de los fluorocromos de los anticuerpos secundarios. Se capturaron y digitalizaron las imágenes mediante el software Metamorph usando el objetivo de 40x inmersión en aceite, las tomas fueron en 2 longitudes de onda de la misma región para ser proyectadas por separado. Las imágenes tuvieron un tamaño de 1024x1024 píxeles, se buscó abarcar toda el área del ganglio. Para las muestras de médula se buscó identificar y capturar el área correspondiente al núcleo IML.

El análisis de las imágenes y cuantificación de las marcas en el GCS se hizo con el software de procesamiento de imágenes. Las imágenes obtenidas de los 2 canales de una sola región se superpusieron para ser procesadas en un plano bidimensional. Se usaron pseudocolores; rojo para GAD67 y verde para VChT y ChAT pudiendo observar la sobreposición de marca como amarillo (rojo+verde). Para el cálculo de la co-existencia se usó la razón de píxeles en fibras y botones que expresan ambas marcas en relación con botones y fibras que solo expresaban una; de tal forma que la razón 1 es una completa co-expresión y 0 representa una localización topográfica diferente de los marcadores. La segregación se mostró como el porcentaje en píxeles de las fibras y botones que expresan solo uno de los dos marcadores analizados. La expresión total fue evaluada como el total de píxeles para solo alguna de las marcas entre el total de píxeles del área total del ganglio (Ejemplo Anexo 1).

Posteriormente se estudió si la segregación y expresión de los neurotransmisores marcados mostraban algún patrón topográfico determinado. Para ello se dividió el GCS en 2 áreas equivalentes una superior y la otra inferior y por separado se

estudió la segregación y expresión en cada región. Las regiones fueron: 1) rostral: relacionada con las eferencias del GCS que proyectan por el NCI y 2) caudal: relacionada con las salidas por el NCE.

El análisis de las imágenes de la médula se realizó en cortes transversales ubicando la región del núcleo IML en donde se encuentran los cuerpos celulares que mandan sus eferencias hacia el GCS. Los cortes se observaron y capturaron digitalmente en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Eclipse), se buscaron los somas que expresaban GAD67 y ChAT.

6. Curvas estímulo/respuesta (input/output; I/O)

Para explorar si los cambios morfológicos presentan una relación con cambios funcionales, las ratas SHR y WKy fueron anestesiadas con Xilazina (10mg/Kg) y Ketamina (90mg/Kg). Se disecó de la manera más rápida posible el GCS eliminando su respectiva capa de tejido conectivo, se colocó en una cámara de registro de 1mL de capacidad previamente llenada con solución Ringer-Krebs (NaCl 140mM, KCl 4mM, KH₂PO₄ 1mM, MgCl₂ 1mM, Glucosa 11mM, CaCl 2mM, NaHCO₃ 12mM), manteniendo una temperatura constante (24-25°C) con perfusión de mezcla de gases (Oxígeno 95% y CO₂ 5%) y un pH de 7.4. El nervio preganglionar fue introducido por succión a un electrodo de vidrio conectado a un estimulador. Los NCI y NCE se conectaron por separado y uno a la vez por medio de succión a otro electrodo de vidrio el cual estuvo conectado a un amplificador para aumentar la señal generada x100.

Las curvas I/O se realizaron registrando y grabando las respuestas amplificadas (output) en forma de potenciales de acción compuestos (PAC) al aumentar gradualmente el voltaje de los pulsos de estímulo (input) (100 ms a 0.2Hz de frecuencia) hasta alcanzar la respuesta supramáxima. Las señales generadas fueron digitalizadas y se visualizaron gráficamente por medio de un programa de adquisición de datos (LabView) para posteriormente ser analizadas y comparadas (SHR vs WKy).

7. Análisis estadístico

En el análisis de inmunofluorescencia los datos obtenidos se graficaron como el promedio \pm SEM del porcentaje de segregación y por otra parte el promedio de porcentaje de expresión de VACHT y GAD67 en GCS de SHR y WKy respectivamente, las diferencias de la segregación y expresión de neurotransmisores entre las cepas de ratas se evaluaron usando la prueba T-student con un límite de confianza del 95% ($\alpha=0.05$).

En las curvas estímulo/respuesta los datos obtenidos se graficaron en función del voltaje de entrada y salida (promedio \pm SEM) y se comparó con una prueba T-student con un límite de confianza del 95% ($\alpha=0.05$).

Se consideran estadísticamente significativo valores con $p<0.05$ y no significativo con $p\geq 0.05$.

RESULTADOS

1.- Presencia de neuronas preganglionares simpáticas GABAérgicas y colinérgicas en las astas intermediolaterales de la médula espinal

En la sustancia gris de cortes transversales del segmento torácico de la médula espinal de SHR y WKy varios cuerpos celulares mostraron inmunoreactividad para ChAT principalmente los del asta ventral; que por su tamaño (40um aprox.) pudieran ser motoneuronas que inervan músculo esquelético mientras que en las astas intermedias los somas con ChAT-IR se encontraron en el área autonómica del núcleo IML (Fig. 4). En esta región se observaron grupos de 6 ± 3 neuronas con una forma ovoide y fusiforme y un tamaño aproximado de 20um, lo cual corresponde a las neuronas preganglionares simpáticas (SPN).

La mayor parte de marca para GAD67 se encontró como un patrón homogéneo de fibras varicosas ramificadas en toda la sustancia gris en ambas ratas. Para demostrar la GAD67-IR en los somas de las SPN se comparó la intensidad de la marca detectada en sus somas respecto a células que se sabe no son GABAérgicas (motoneuronas), el método se realizó en ambas cepas de rata y solo se observaron cuerpos celulares evidentemente positivos a GAD67 en el núcleo IML de médula de SHR, esta detección fue sin necesidad recurrir a la inhibición del transporte axonal hacia el GCS con colchicina, el cual es un procedimiento indispensable para la detección en ratas Wistar.¹ En el núcleo IML de ratas SHR todas las neuronas que mostraron marca para GAD67 co-expresaron marca para ChAT, por otra parte no todas las neuronas con marca para ChAT fueron positivas a GAD67 (Fig. 4).

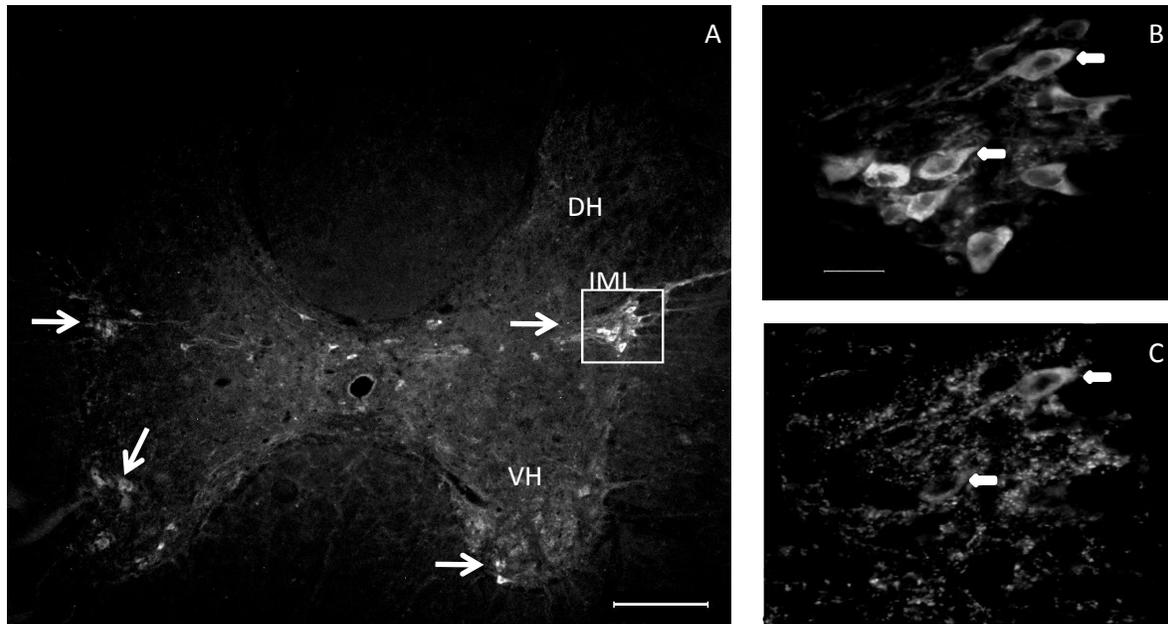


Figura 4. GAD67 se expresa en los somas de SPN en SHR.

A) Corte de médula transversal donde se muestra la médula marcada con inmunofluorescencia contra y ChAT y GAD67. Con letras blancas se señalan las principales regiones que son el asta dorsal (DH), asta ventral (VH) y canal central (CC), así como la localización del núcleo intermedio lateral (IML) en donde se encuentran las SPN, las flechas indican 4 regiones celulares con ChAT-IR. Barra 200 μ m. B) Se muestra una ampliación de la región autonómica del IML en donde se pueden ver las SPN con una marca positiva a ChAT. C) se observa la misma área autonómica ahora con inmunoreactividad a GAD67, las flechas están indicando los cuerpos celulares que mostraron co-expresión de ambos marcadores. Barra 20 μ m.

2. Segregación de ACh y GABA

Tabla 1. Resultados de segregación de GABA y ACh en GCS

Variable	SHR n=5	WKy n=5
Segregación GABA general	43.5 \pm 5	40.8 \pm 3
Segregación GABA región rostral	40 \pm 6	39 \pm 6
Segregación GABA región caudal	47.2 \pm 8	50.3 \pm 5
Segregación ACh general	91.49 \pm 1.4	94.7 \pm 1.5

Se muestran los resultados de la segregación de GABA y ACh como el porcentaje (media \pm SEM) de la presencia de inmunoreactividad hacia solo alguno de los dos marcadores dentro del área total del GCS o de la región especificada.

En el GCS de SHR y WKy se confirmó que existe segregación entre ACh y GABA como sucede en la rata Wistar³³

Al analizar la segregación de GABA (terminales con solo marca para GAD67) se encontró que no hay una diferencia significativa entre SHR y WKy. En SHR el 43.52±5% de GABA estaba segregado de ACh y el porcentaje restante se encontraba co-expresado en las terminales colinérgicas. En las ratas WKy se encontró un porcentaje similar (40.81±3%) para la segregación de GABA. Al hacer el análisis estadístico no resultaron significativamente diferentes ($p \geq 0.05$).

En el caso del análisis por regiones en el ganglio, aunque hay una tendencia a estar más segregado GABA en la región caudal (SHR 47.2±8.4; WKy 50.3±5%) no se encontró una diferencia estadísticamente significativa respecto a la región rostral (SHR 40±6%; WKy 39±6%) como sucede en las ratas Wistar¹. Para la segregación de acetilcolina (marcada por VACHT) tampoco hubo una diferencia significativa entre SHR (91.49±1.4%) y WKy (94.7±1.5%) ($p \geq 0.05$; Fig. 5).

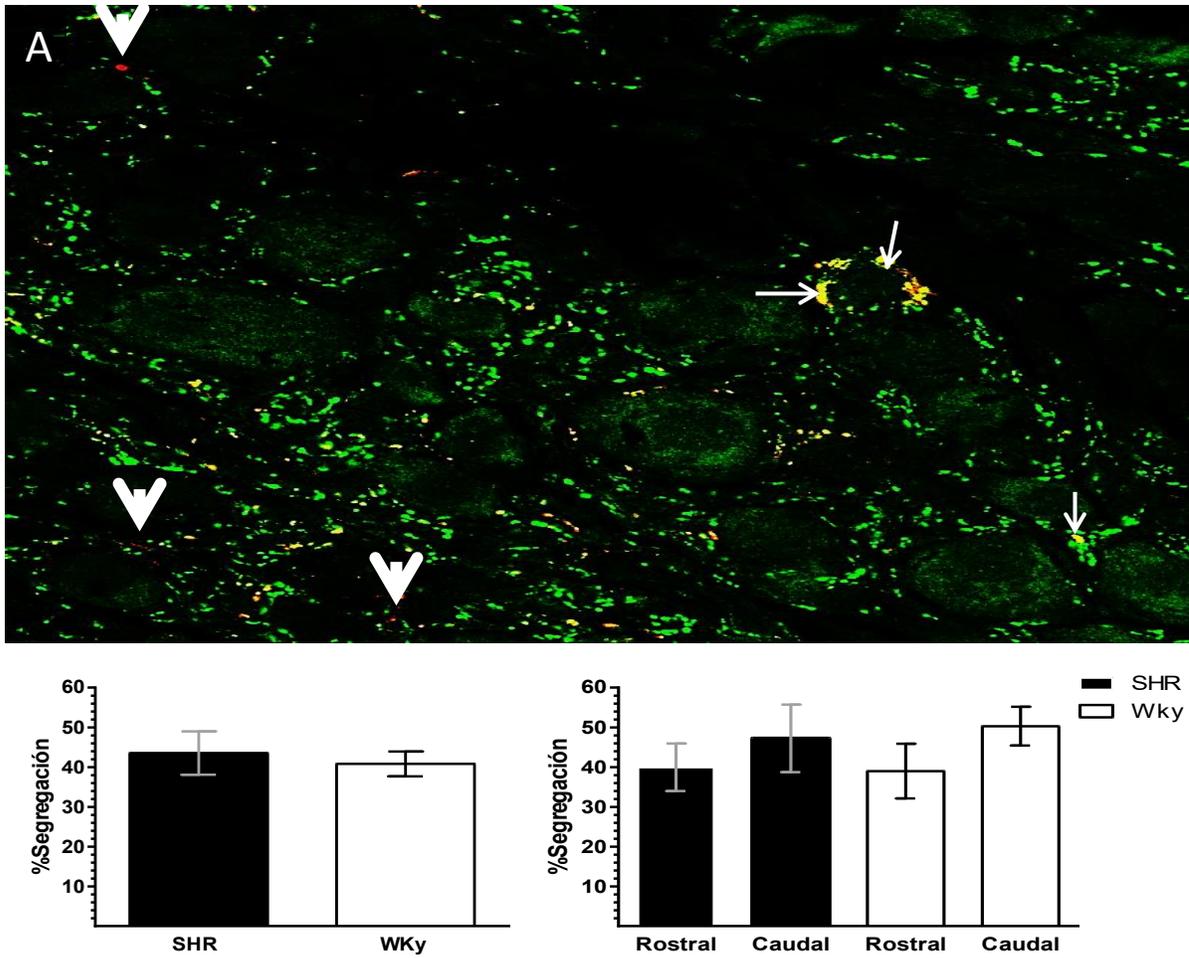


Figura 5. No hay diferencia en la segregación de GABA entre SHR y WKy

En la figura se observa una región del GCS de SHR, en donde se pueden observar terminales de las SPN. Las flechas gruesas muestran botones rojos; solo con expresión para GABA (segregación) y las flechas delgadas muestran botones amarillos; terminales co-expresando GABA y ACh. En verde se muestran las terminales colinérgicas. En la gráfica izquierda se observa el porcentaje (media±SEM) de segregación general de GABA en GCS de ratas SHR vs WKy. En la parte derecha se observa la regionalización de la segregación de GABA (media±SEM). No hay diferencia significativa entre ambas regiones ($p > 0.05$).

3.- Expresión y distribución total y regional de GABA y ACh

Tabla 2. Expresión y distribución de GABA y ACh en GCS

Variable	SHR n=5	WKy n=5
Expresión de GABA total	0.129±0.03	0.03±0.01 *
Expresión de GABA región rostral	0.1±0.02	0.02±0.008
Expresión de GABA región caudal	0.028±0.007	0.01±0.003
Expresión de ACh total	0.80±0.2	0.53±0.13
Voltaje de máxima respuesta NCI	0.24±0.02	0.16±0.02*
Voltaje de máxima respuesta NCE	0.13±0.02	0.11±0.01

Los resultados de la expresión se muestran como el porcentaje de área de la marca (media±SEM) respecto al área total del GCS o de la región de interés. Los voltajes de respuesta corresponden a los resultados de la sección cuatro y se muestran como la respuesta máxima en Volts (media±SEM) alcanzada por las vías de salida del GCS. Marcados con asterisco se muestran los resultados estadísticamente significativos. Prueba t $p<0.05$

La expresión de GABA aumenta y cambia la distribución regional en las terminales presinápticas GABAérgicas en el GCS de SHR respecto a WKy

La presencia de GABA en las terminales de las SPN se detectó a través de la inmunoreactividad (IR) para el marcador GAD67. Esta IR se encontró en mayor proporción como fibras varicosas rodeando a neuronas ganglionares en todo su perímetro celular formando estructuras tipo canastas y en menor proporción como fibras localizadas entre los cuerpos celulares.

Se encontró una diferencia evidente en la presencia de GAD67 entre ambas cepas de rata. En ratas WKy el área con GAD67-IR fue de $0.03 \pm 0.01\%$; del área total de la superficie del GCS mientras que en SHR el área ocupada por el mismo marcador ocupó el $0.1290 \pm 0.03\%$. ($p<0.05$).

Por otra parte al analizar la distribución de la marca en las 2 regiones del ganglio también se encontró una distribución diferenciada en la SHR; la inmunoreactividad en el área rostral fue de $0.1 \pm 0.02\%$ y en la caudal $0.028 \pm 0.007\%$ ($p<0.05$). No así en la WKy donde la distribución solo mostró una tendencia de un gradiente rostro-caudal (área rostral de $0.02 \pm 0.008\%$ y en la caudal $0.01 \pm 0.003\%$) ($p \geq 0.05$; Fig. 6).

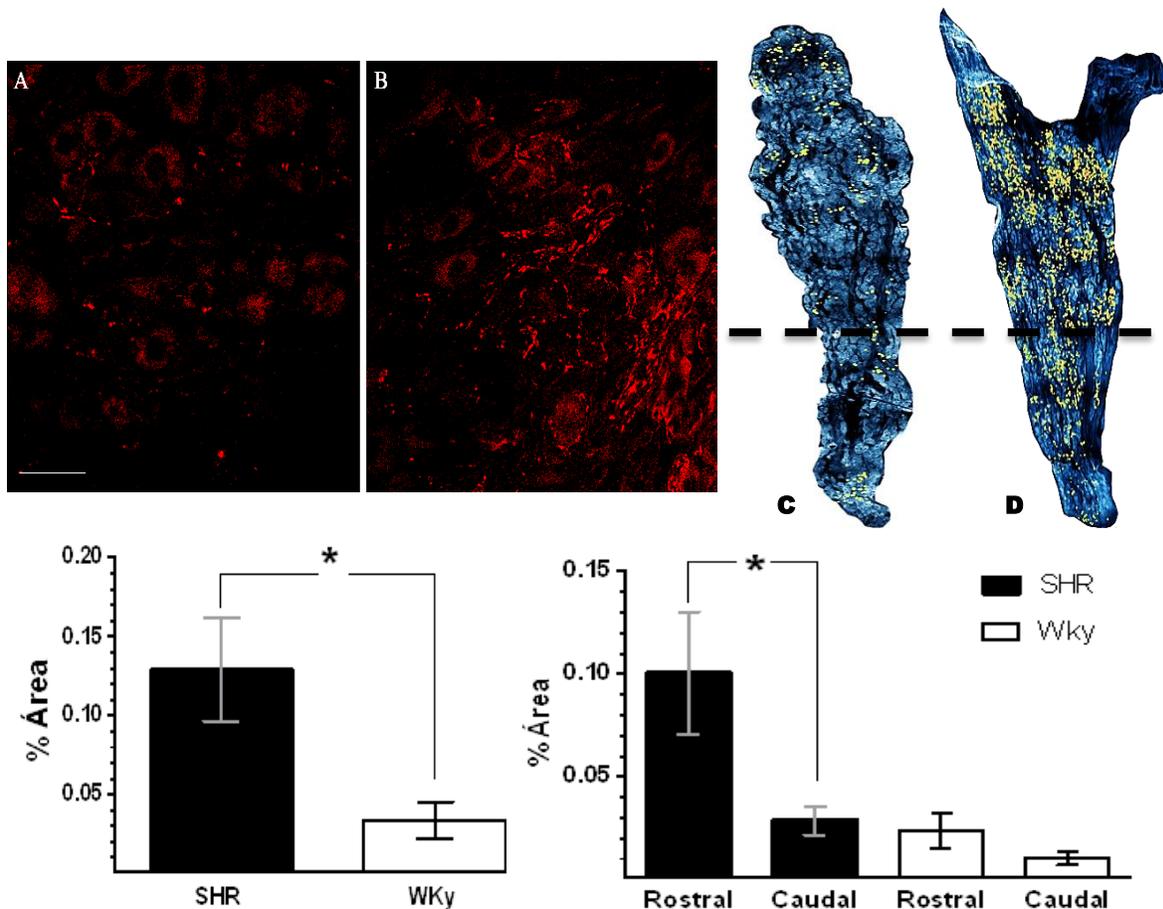


Figura 6. Hay mayor inmunoreactividad a GAD67 en el GCS de SHR respecto a WKy.

En la parte superior izquierda se observan dos fotomicrografías del GCS con GAD67-IR, en puntos y algunas fibras rojo intenso se observa GAD67-IR en GCS de Wky (A) y SHR (B) (barra 20µm). En la parte superior derecha se observan dos cortes longitudinales de GCS Wky (C) y SHR (D), en ambas imágenes se observa el tejido nervioso como fondo azul y la GAD67-IR en amarillo; la línea punteada horizontal que atraviesa por la mitad separa las 2 regiones del ganglio; rostral (superior) y caudal (inferior). La gráfica inferior izquierda muestra la comparación del porcentaje de área que corresponde a la marca de GAD67 respecto a toda el área del GCS en SHR y WKy. ($p < 0.05$). La gráfica inferior derecha muestra el porcentaje de GAD-IR regionalizado en los ganglios de las dos cepas de rata. (media±SEM)

Por otra parte se confirmó la presencia de acetilcolina en GCS de SHR y WKy usando como marcador VAcHT. La inmunoreactividad de VAcHT en el GCS se presentó morfológicamente como fibras que atravesaban el ganglio así como en mayor proporción fibras con una ubicación pericelular. Su distribución fue homogénea a lo largo de todo el GCS tanto en SHR como en WKy. Hay una

tendencia a aumentar VACHT en SHR pero no hubo una diferencia significativa entre las dos cepas de ratas (SHR $0.80 \pm 0.2\%$; WKy $0.53 \pm 0.13\%$. $p \geq 0.05$; Fig. 7)

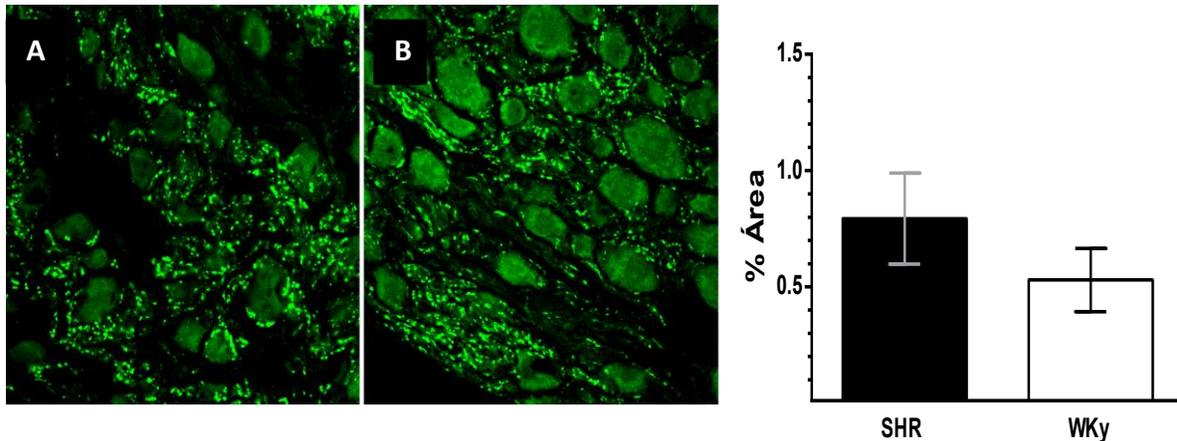


Figura 7. No hay diferencia en la presencia de VACHT entre SHR y WKy.

En la parte izquierda se muestran 2 microfotografías de región del GCS de WKy (A) y de SHR (B) con VACHT-IR. La marca para VACHT puede observarse como el punteado verde brillante alrededor de los somas y pasando como fibras entre ellos. Del lado derecho se muestra una gráfica con el porcentaje promedio \pm SEM de área de VACHT-IR respecto al área total del GCS en cada cepa de rata. ($p \geq 0.05$)

4. Curvas estímulo/respuesta

Se encontró diferente eficiencia en la transmisión en GCS

En los resultados de las curvas I/O en ambas cepas de rata se encontró una diferencia en el GCS; la eficiencia de las neuronas caudales registradas vía NCE fue diferente a la de las neuronas rostrales registradas vía NCI ya que a 1 V de entrada inició la respuesta en el NCE, sin embargo las respuestas del NCE fueron mayores a voltajes bajos de estimulación, mientras que a voltajes más altos las respuestas se invirtieron siendo mayor las del NCI (fig. 8). Por otra parte en la rata WKy no hubo diferencia en la transmisión entre ambos nervios (NCI: $0.16 \pm 0.02V$ NCE: $0.11 \pm 0.01V$ $p \geq 0.05$) mientras que en la SHR si la hubo (NCI: $0.24 \pm 0.02V$ NCE: $0.13 \pm 0.02V$ $p < 0.05$). Así también hubo una diferencia significativa entre el NCI de SHR respecto al NCI de WKy ($p < 0.05$).

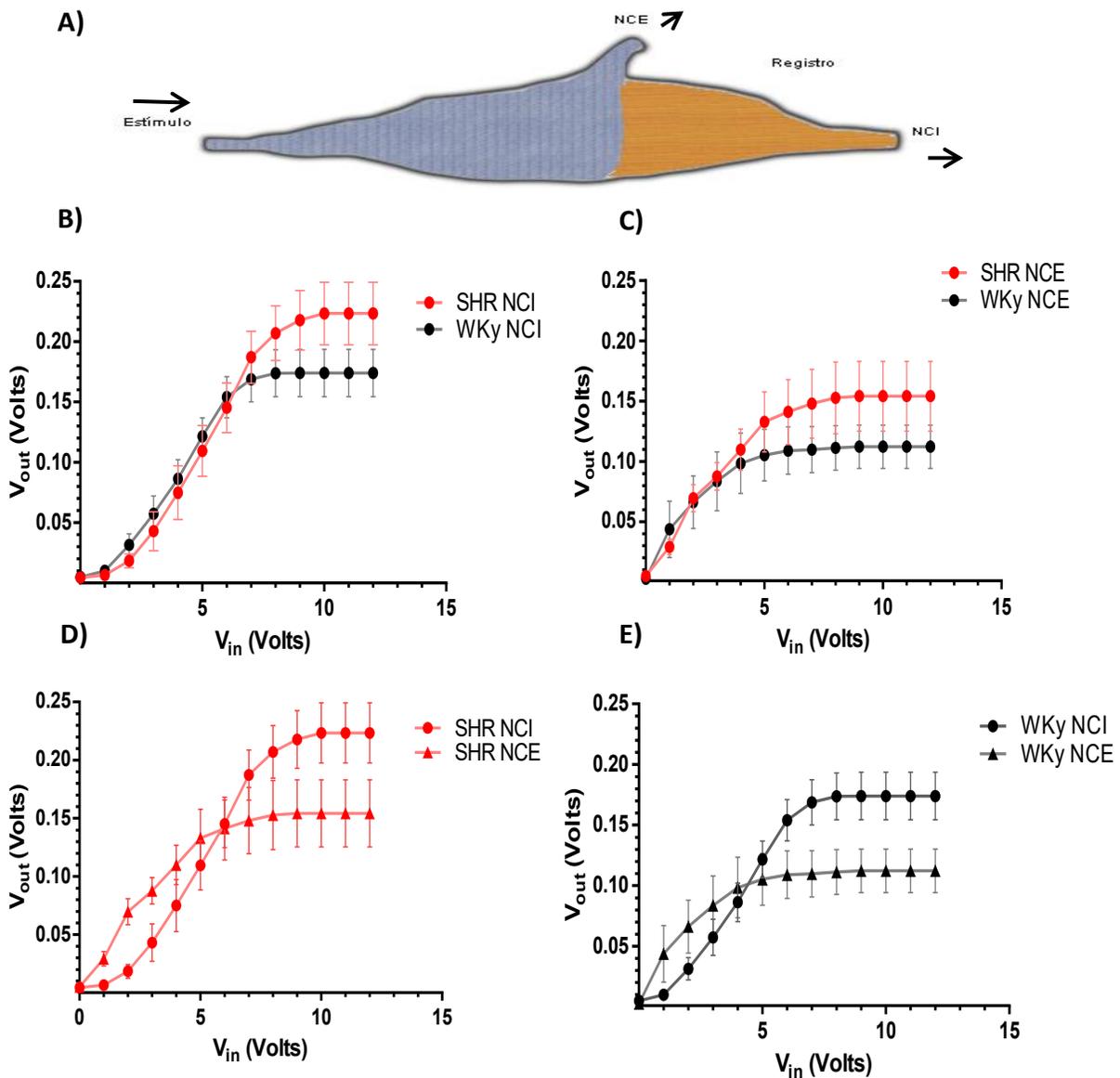


Figura 8. La transmisión nerviosa es distinta entre el NCI y NCE en SHR y WKy.

En A) se muestra un esquema del GCS; donde se indican los nervios de estimulación y registro, así como las regiones ganglionares (azul caudal; amarillo rostral). Las cuatro gráficas relacionan el estímulo al GCS, es decir el voltaje de entrada (V_{in}) con el voltaje de salida (V_{out}) el cual se obtiene registrando NCE y NCI. En la gráfica B) se observa las curvas que representan los registros de NCI de SHR y WKy y en la C) se observa una gráfica con los registros del NCE de SHR y WKy respectivamente. En la parte inferior se muestra en D) la comparación del registro de NCI y NCE en GCS de SHR y en la gráfica E) los registros de los nervios de WKy.

DISCUSIÓN

Los hallazgos del presente trabajo muestran que en la HTA del modelo de SHR (PA sistólica: 187 ± 15 mmHG diastólica: 129 ± 17 mmHg, $n=4$) aumenta la presencia de GABA en las SPN y cambia la distribución regional de las fibras GABAérgicas preganglionares en el GCS. Por otra parte los resultados confirman el origen preganglionar de GABA presente en el GCS, así como la segregación de GABA y ACh en las fibras preganglionares simpáticas. Como en el caso de la hiperactividad simpática reportada en la hipertensión, se encontró una tendencia de mayor responsividad sináptica en los ganglios de las SHR.

Los resultados confirman la presencia de fibras con inmunoreactividad a GABA, así como la preferencia rostral de su ubicación en el GCS reportada por varios grupos de trabajo.^{33,50-52} De acuerdo a la total co-expresión de ChAT y GAD67 en los somas de las NPS que se encuentran en médula, se esperaría encontrar en el GCS todas las terminales GABAérgicas con marca también para VACHT; de acuerdo al Principio de Dale, sin embargo se confirmó que las SPN tienen la capacidad de distribuir diferencialmente (segregar) GABA y ACh hacia diferentes varicosidades.³³

En el GCS, GABA al unirse a sus receptores ($GABA_A$ y/o $GABA_B$) activa mecanismos moduladores inhibidores de la respuesta postganglionar³⁷, o también puede inhibir la liberación de ACh en las terminales presinápticas.³⁸ Los resultados de este trabajo muestran que GABA marcado por la enzima GAD67 está evidentemente aumentado en SHR (respecto a WKy) en las terminales de las SPN esto pudiera ser un mecanismo de plasticidad homeostática en el SNS, ya que el aumento de GABA posiblemente refleje un mecanismo compensatorio para amortiguar la hiperactividad simpática reportada en estas ratas hipertensas.^{43, 44, 46} De modo que GABA interactuando en la presinapsis podría disminuir la liberación de ACh o en la postsinapsis inhibir la respuesta colinérgica de las neuronas postganglionares. Considerando que uno de los factores importantes para la

eficacia de la inhibición GABAérgica es la persistente activación de sus receptores y que estos receptores son de baja afinidad, el hecho de liberar mayor cantidad de GABA en la SHR pudiera ser un mecanismo para hacer más eficiente la activación de receptores GABAérgicos pre o postsinápticos, o adicionalmente para alcanzar receptores extrasinápticos, que se sabe tienen mayor afinidad por GABA.^{53, 54}

Se encontró que el gradiente rostro-caudal de la distribución ganglionar de GABA reportada en la rata Wistar^{33, 50, 51} se encuentra más evidente en SHR pero no se detectó en las WKy. Considerando que la distribución regional de las neuronas ganglionares se correlaciona con la inervación de diferentes blancos^{4-6, 56} y que la actividad nerviosa está regulada por las interacciones tróficas entre las neuronas y sus blancos (neurotrofinas), podría esperarse que en la HTA de las SHR, las neuronas rostrales encargadas de inervar partes como el iris, glándula pineal y gran cantidad de vasculatura de la cabeza sean las más hiperactivas, lo que implicaría una mayor presencia de GABA en esta región para reducir esta hiperactividad. Posiblemente las neuronas caudales que inervan en gran parte tejido de tipo secretomotor o glandular como las glándulas salivales⁵⁶ no presentarían gran hiperactividad ni mayor inhibición compensatoria GABAérgica. Sería de gran importancia investigar la diferencia precisa en la transmisión GABAérgica entre las 2 poblaciones neuronales.

Por otra parte en el análisis de segregación de GABA no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre las ratas SHR y WKy. Una posible explicación de este resultado es que al haber un aumento de GABA en SHR, este sea el resultado de una mayor síntesis y envío del neurotransmisor en las terminales que ya contenían acetilcolina con el fin de inhibir o disminuir la actividad colinérgica; proceso que aumentaría la co-expresión de ambos neurotransmisores pero también hay una tendencia a aumentar ACh en SHR. Aunque la proporción total de segregación no fue diferente entre las ratas SHR y WKy, llama la atención que en ambas cepas se perdió la regionalización de la segregación encontrada en la rata Wistar.³³ Esto pudiera estar relacionado a la manera histórica en que se obtuvieron las cepas de WKy y SHR.⁴⁸

En los resultados obtenidos de las curvas I/O se observó que el NCI en las ratas SHR y WKy tiene una transmisión más eficiente ya que se alcanzaron respuestas mayores respecto al NCE usando voltajes de entrada semejantes, esta diferencia solo fue significativa en SHR. Entre SHR y las WKy se observó una diferencia significativa en la vía del NCI alcanzando una respuesta mayor en SHR, lo cual está en relación con la hiperactividad simpática reportada en varios estudios.⁴⁴⁻⁴⁶ Sin embargo sin el estudio fino y profundo de los mecanismos GABAérgicos es un tanto complicado entender porque el NCI en SHR tiene una actividad aumentada mientras que la población a la que está relacionado tiene mayor aferencias GABAérgicas. Es posible que GABA esté jugando un papel de sincronización como sucede en las conexiones corticales, donde por mecanismos GABAérgicos se sincroniza el disparo de las neuronas piramidales;⁵⁷ entonces al sincronizar el disparo de una gran parte de la población puede que se vea reflejado en el aumento de la actividad simpática en la ventana de tiempo en que se está registrando la respuesta del NCI del GCS.

En este trabajo se trata de vincular 2 vías importantes del sistema nervioso simpático: vía inhibitoria y excitatoria y el posible papel que ambas juegan en los cambios que suceden en la fisiopatología de la HTA. Así mismo, este trabajo aporta bases en el estudio de la transmisión nerviosa GABAérgica en el SNS. Además de GABA y ACh existen múltiples sustancias como los neuropéptidos que modulan el flujo de información en el GCS y que sería relevante su estudio ya que es posible que estén jugando un papel importante en esta fisiopatología.

CONCLUSIONES

- 1.- Hay un evidente aumento en la presencia de GABA en GCS de SHR respecto a WKy.
- 2.- La mayoría de las neuronas inervadas por GABA se localizan evidentemente en la región rostral del GCS de SHR, no así en WKy.
- 3.- La transmisión ganglionar es mayor en SHR con respecto al de WKy; a su vez muestra más actividad en la población de neuronas en el área rostral a través del NCI respecto a las neuronas caudales (NCE).
- 4.- Se confirma que existe segregación general entre GABA y ACh sin embargo los cambios no son evidentes entre las ratas SHR y WKy, por otra parte la segregación no muestra un patrón topográfico específico en el GCS.

PERSPECTIVAS

Investigar proporción, ubicación y tipo de receptores GABA en GCS de SHR.

Mediante farmacología tratar de dilucidar el papel de GABA en la transmisión nerviosa del GCS.

Analizar posibles cambios en expresión, regionalización y segregación de neuropéptidos en SHR, así como su contribución en la transmisión nerviosa en GCS.

REFERENCIAS

1. Hamill RW, Shapiro RE, Vizzard MA. Peripheral autonomic nervous system, chap. 4. In: Robertson D, Biaggioni I, Burnstock G, Low PA, Paton JFR, editors. *Primer on the autonomic nervous system*. London: Academic Press. 2012;17–26.
2. Colin R, Janet R, Elspeth M. Spinal Autonomic Preganglionic Neurons. Chap. 8. In *The Spinal Cord*, edited by Charles Watson George Paxinos Gulgun Kayalioglu, San Diego: Academic Press. 2009;115-129.
3. Llewellyn-Smith IJ. Anatomy of synaptic circuits controlling the activity of sympathetic preganglionic neurons. *J Chem Neuroanat*. 2009;38:231–9.
4. Gibbins IL, Jobling P, Messenger JP, Teo EH, Morris JL. Neuronal morphology and the synaptic organisation of sympathetic ganglia. *J Auton Nerv Syst*. 2000;81:104–109.
5. Li C, Horn JP. Physiological classification of sympathetic neurons in the rat superior cervical ganglion. *J Neurophysiol*. 2006;95:187–195.
6. Bowers CW, Zigmond RE. Localization of neurons in the rat superior cervical ganglion that project into different postganglionic trunks. *J Comp Neurol*. 1979;185:381–391.
7. Eccles JC. Developing concepts of the synapses. *J Neurosci*. 1990;10:3769–3781.

8. Pereda AE, Curti S, Hoge G, Cachope R, Carmen E, Rash JE, *et al.* Gap junction-mediated electrical transmission: regulatory mechanisms and plasticity. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1828(1):134–146.
9. Bennett MVL. Gap Junctions and Electrical Synapses. *Encycl Neurosci*. 2010;366:529–548.
10. Matthews G. Neurotransmitter release. *Annu Rev Neurosci*. 1996; 19:219-233.
11. Kelly RB. Storage and release of neurotransmitters. *Neuron*. 1993; 10:43–53.
12. Pereda AE. Electrical synapses and their functional interactions with chemical synapses. *Nat Rev Neurosci*. 2014;15(4):250-263.
13. Zigmond MJ. Otto Loewi and the demonstration of chemical neurotransmission. *Brain Res Bull*. 1999;50(99):347–348.
14. Strata P, Harvey R. Dale's principle. *Brain Res Bull*. 1999;50(99):349–350.
15. Eccles J.C. Chemical transmission and Dale's principle. *Prog Brain Res*. 1986;68:3-13.
16. Burnstock G. Do some nerve release more than one transmitter? *Neuroscience*. 1976;1:239-248.
17. Burnstock G. Cotransmission. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4:47-52.

18. Hökfelt T, Millhorn D, Seroogy K, Tsuruo Y, Ceccatelli S, Lindh B, *et al.* Coexistence of peptides with classical neurotransmitters. *Experientia*. 1987;43:768–780.
19. Merighi A. Costorage and coexistence of neuropeptides in the mammalian CNS. *Prog Neurobiol*. 2002;66:161–190.
20. Merighi A, Salio C, Ferrini F, Lossi L. Neuromodulatory function of neuropeptides in the normal CNS. *J Chem Neuroanat*. Elsevier B.V. 2011;42(4):276–287.
21. Lundberg JM, Hökfelt T. Multiple co-existence of peptides and classical transmitters in peripheral autonomic and sensory neurons-functional and pharmacological implications. *Prog Brain Res*. 1986;68:241–262.
22. Trudeau LE, Gutiérrez R. On cotransmission & neurotransmitter phenotype plasticity. *Mol Interv*. 2007;7:138–146.
23. Hnasko TS, Edwards RH. Neurotransmitter Corelease: Mechanism and Physiological Role. *Annu Rev Physiol*. 2012;74:225–243.
24. Seal RP, Edwards RH. Functional implications of neurotransmitter co-release: Glutamate and GABA share the load. *Curr Opin Pharmacol*. 2006;6:114–119.
25. Marder E. Neural signalling: Does colocalization imply cotransmission? *Curr Biol*. 1999;9:R809–811.
26. Fisher JM, Sossin W, Newcomb R, Scheller RH. Multiple neuropeptides derived from a common precursor are differentially packaged and transported. *Cell*. 1988;54:813–822.

27. Sossin WS, Sweet-Cordero a, Scheller RH. Dale's hypothesis revisited: different neuropeptides derived from a common prohormone are targeted to different processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990;87:4845–4848.
28. Nishimaru H, Restrepo CE, Ryge J, Yanagawa Y, Kiehn O. Mammalian motor neurons corelease glutamate and acetylcholine at central synapses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(14):5245–5249.
29. Sulzer D, Joyce MP, Lin L, Geldwert D, Haber SN, Hattori T, *et al*. Dopamine neurons make glutamatergic synapses in vitro. *J Neurosci*. 1998;18(12):4588–4602.
30. Sámano C, Zetina ME, Cifuentes F, Morales MA. Segregation of met-enkephalin from vesicular acetylcholine transporter and choline acetyltransferase in sympathetic preganglionic varicosities mostly lacking synaptophysin and synaptotagmin. *Neuroscience*. 2009;163(1):180–189.
31. Sámano C, Zetina ME, Mariín MA, Cifuentes F, Morales MA. Choline acetyl transferase and neuropeptide immunoreactivities are colocalized in somata, but preferentially localized in distinct axon fibers and boutons of cat sympathetic preganglionic neurons. *Synapse*. 2006;60:295–306.
32. Vega A, Luther JA, Birren SJ, Morales MA. Segregation of the sympathetic classical transmitters (ACh and NE) and the co-transmitter (NPY): modulation by CNTF or growth in culture. *Develop Neurobiol*. 2010;70:913-928.
33. Elinos D, Cifuentes F, Morales MA. Segregation of classic neurotransmitters in neurons of in vivo sympathetic ganglia. Program No. 742.19. Abstract Viewer and Itinerary Planner New Orleans LA: 42th

Annual meeting of The Society for Neuroscience, 2012. Online.
<http://goo.gl/U90KO7>.(Artículo en revisión)

34. Ito T, Hioki H, Nakamura K, Tanaka Y, Nakade H, Kaneko T, Iino S, Nojyo Y. Aminobutyric acid-containing sympathetic preganglionic neurons in rat thoracic spinal cord send their axons to the superior cervical ganglion. *J Comp Neurol*. 2007;502:113–125.
35. Fenalti G, Law RH, Buckle AM, Langendorf C, Tuck K, Rosado CJ, Faux NG, Mahmood K, Hampe CS, Banga JP, Wilce M, Schmidberger J, Rossjohn J, El-Kabbani O, Pike RN, Smith AI, Mackay IR, Rowley MJ, Whisstock JC. GABA production by glutamic acid decarboxylase is regulated by a dynamic catalytic loop. *Nat Struct Mol Biol*. 2007;14:280 – 286.
36. McIntire SL, Reimer RJ, Schuske K, Edwards RH, Jorgensen EM. Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature*. 1997;389:870–876.
37. Adams PR, Brown D a. Actions of gamma-aminobutyric acid on sympathetic ganglion cells. *J Physiol*. 1975;250:85–120.
38. Farkas Z, Kasa P, Balcar VJ, Jo F, Wolffqr JR. Type A and B GABA receptors mediate inhibition of acetylcholine release from cholinergic nerve terminals in the superior cervical ganglion of rat. *Neurochem Int* 1986;8(4):565–572.
39. Vega A, Cancino-Rodezno A, Valle-Leija P, Sánchez-Tafolla BM, Elinos D, Cifuentes F, and Morales MA. Neurotrophin-dependent plasticity of neurotransmitter segregation in the rat superior cervical ganglion *in vivo*.

Develop Neurobiol. 2015. Online
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dneu.22362/abstract>.

40. American Society of Hypertension. La presión arterial y su salud [monografía en Internet]. 2010 American Society of Hypertension, [acceso 2 de febrero de 2016]. Disponible en: <http://www.ash-us.org/documents/BloodPressureHealthSpanish.pdf>
41. Kearney P, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton P, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet*. 2005;365:217–223.
42. Carretero O, Oparil S. Essential Hypertension; Part I: Definition and Etiology. *Clinical Cardiology: New Frontiers*. 2003;2383–2389.
43. Carthy ER. Autonomic dysfunction in essential hypertension: A systematic review. *Ann Med Surg*. 2014;3(1):2-7.
44. Giuseppe M, Grassi G. The autonomic Nervous System and Hypertension. *Circ Res*. 2014;114:1804-1814.
45. Esler M, Rumantir M, Kaye D, Jennings G, Hastings J, Socratous F, *et al*. Sympathetic nerve biology in essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001;28:986–989.
46. Shanks J, Herring N. Peripheral cardiac sympathetic hyperactivity in cardiovascular disease: role of neuropeptides. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013;305:R1411–1420.
47. Lee RM, Triggle CR, Cheung DW, Coughlin MD. Structural and functional consequence of neonatal sympathectomy on the blood

- vessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1987;10:328–338.
48. Johnson ML, Ely DL, Turner ME. Genetic divergence between the Wistar-Kyoto rat and the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1992;19:425–427.
 49. Trippodo NC, Frohlich ED. Similarities of genetic (spontaneous) hypertension: Man and rat. *Circ Res*. 1981;48:309–319.
 50. Ito T, Iino S, Nojyo YA. Part of cholinergic fibers in mouse superior cervical ganglia contain GABA or glutamate. *Brain Res*. 2005;1046:234–238.
 51. Wolff JR, Kasa P, Dobo E, Wenthold RJ, Joo F. Quantitative analysis of the number and distribution of neurons richly innervated by GABA-immunoreactive axons in the rat superior cervical ganglion. *J Comp Neurol*. 1989;282:264–273.
 52. Dobó E, Joó F, Wolff JR. Distinct subsets of neuropeptide Y-negative principal neurons receive basket-like innervation from enkephalinergic and gabaergic axons in the superior cervical ganglion of adult rats. *Neuroscience*. 1993;57:833–844.
 53. Belelli D, Harrison NL, Maguire J, Macdonald RL, Matthew C, Cope DW. Extrasynaptic GABA_A receptors: Form, Pharmacology and Function. *J Neurosci*. 2010;29(41):12757–12763.
 54. Park JB, Jo JY, Zheng H, Patel KP, Stern JE. Regulation of tonic GABA inhibitory function, presympathetic neuronal activity and sympathetic

outflow from the paraventricular nucleus by astroglial GABA transporters. *J Physiol.* 2009;587:4645–4660.

55. Farrant M, Nusser Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA(A) receptors. *Nat Rev Neurosci.* 2005;6:215–229.
56. Headley DB, Suhan NM, Horn JP. Rostro-caudal variations in neuronal size reflect the topography of cellular phenotypes in the rat superior cervical sympathetic ganglion. *Brain Res.* 2005;1057:98–104.
57. Cobb *et al.* Synchronization of neuronal activity in hippocampus by individual GABAergic interneurons. *Nature.* 1995;378:75–98.

APÉNDICES

1. Ejemplo de análisis de segregación.

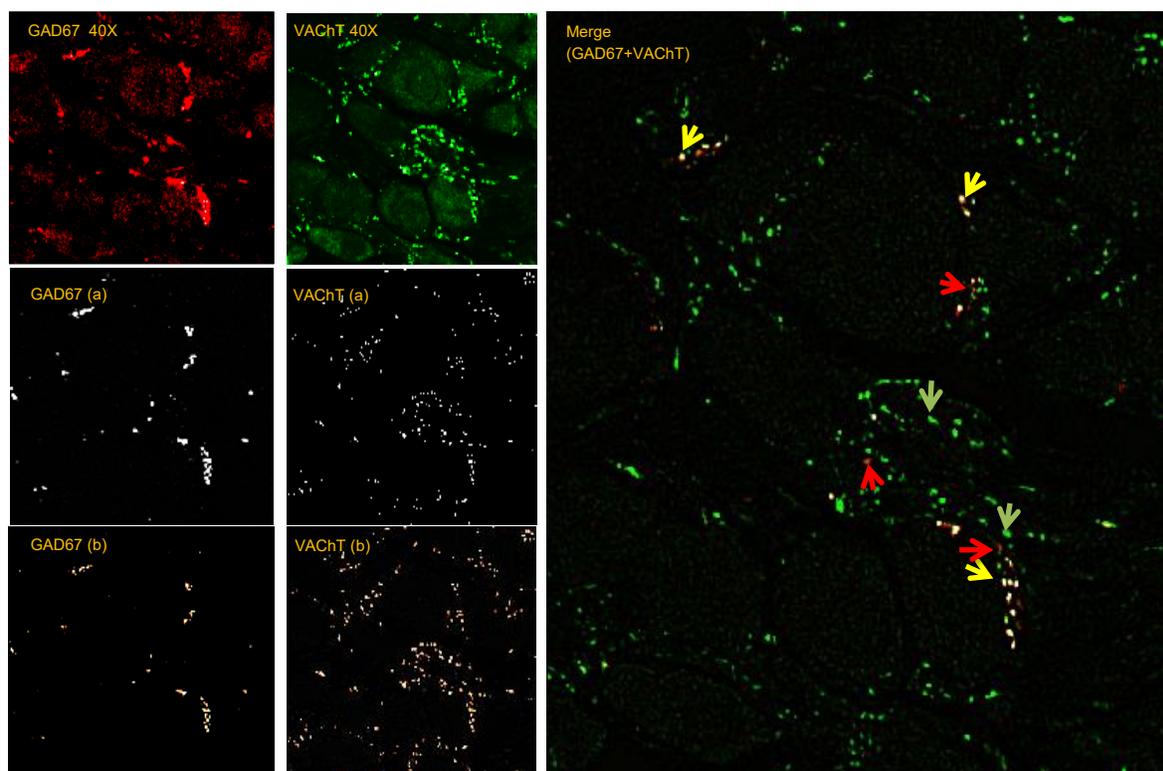


Imagen	Área en píxeles
GAD67	458
VACHT	3986
Merge (amarillo)	197

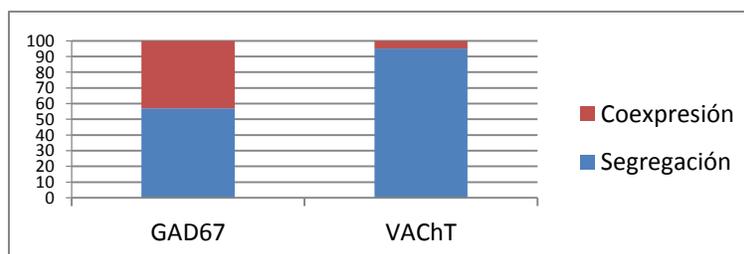


Figura 4. Se muestra un ejemplo gráfico del método para determinar la co-existencia y segregación de GAD67 con VACHT en las terminales presinápticas en el GCS. En el panel superior izquierdo se muestra la captura de 2 canales en el microscopio confocal, ambos de la misma región; uno para GAD67 y el otro para VACHT. (a) Tanto para GAD67 como para VACHT se procesan las imágenes (deconvolución) para mejorar la resolución y nitidez de la marca. (b) A través del software MetaMorph se selecciona el área de nuestro interés (regiones amarillas) y se obtiene la cantidad de píxeles que le corresponde a cada marca. Posteriormente se combinan ambos canales (sobreposición) y se obtienen los píxeles en donde co-existen ambas marcas (flechas amarillas), las flechas rojas y verdes muestran ejemplos de la marca que esta segregada; rojas para GAD67 y verde para VACHT. La tabla inferior izquierda muestra los datos de cada marca y la co-existencia para esa región. La gráfica inferior derecha muestra el porcentaje de segregación, por ejemplo para GAD67 el 100% de marca es 458 píxeles, de los cuales 197 píxeles están co-existiendo con VACHT por lo tanto los restantes 261 píxeles están segregados (56.9%).

2. Cartel presentado en el LVIII Congreso Nacional De la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas.

Análisis de la presencia y segregación de Acetilcolina y GABA en Ganglio Cervical Superior de ratas espontáneamente hipertensas (SHR)



Miguel Filiberto; Cifuentes Fredy; Morales Miguel Angel. Departamento Fisiología Celular y Biología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

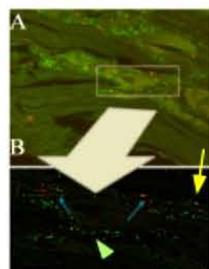
INTRODUCCIÓN

En las sinapsis de carácter químico la cotransmisión es la capacidad que tiene una neurona para operar con más de un neurotransmisor. La forma en que una neurona puede liberar los neurotransmisores sigue al menos dos patrones: Liberar el mismo conjunto de transmisores en todas sus terminales (Principio de Dale) o enviarlos selectivamente hacia alguna terminal específica, es decir segregarlos. La primera es la más aceptada pero a partir de los 90's hasta la actualidad se tienen bastantes evidencias que apoyan la segregación. En el laboratorio se ha evidenciado la segregación entre acetilcolina (ACh) y diversos neuropéptidos en las terminales de neuronas simpáticas en el GCS de rata Wistar. Recientemente también se ha demostrado segregación de ACh y ácido γ -aminobutírico (GABA). Aunado a esto, se ha demostrado que en cultivo la segregación varía por la presencia de factores tróficos. Dado que la segregación es una función plástica regulable por factores del entorno, nos preguntamos si los cambios en la hipertensión pueden modificar la distribución y niveles de segregación de neurotransmisores.

OBJETIVOS

Analizar la presencia y segregación de acetilcolina y GABA en neuronas simpáticas de GCS de ratas SHR y en su control normotenso Wky.

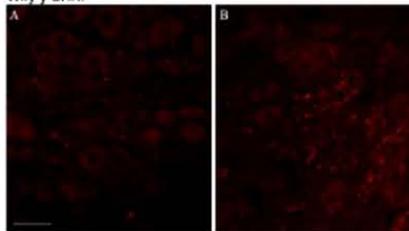
MATERIAL Y MÉTODOS



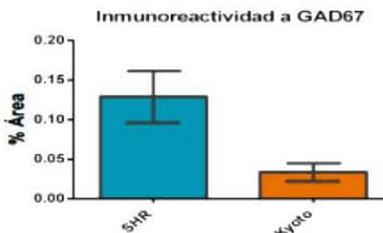
Análisis de la colocalización/segregación de marcadores. (A) Se muestra una imagen combinada con dos marcadores (rojo y verde). (B) Las flechas azules y verdes muestran marca independiente, que no colocalizan (segregados), y la flecha amarilla muestra marca que sí colocaliza.

RESULTADOS

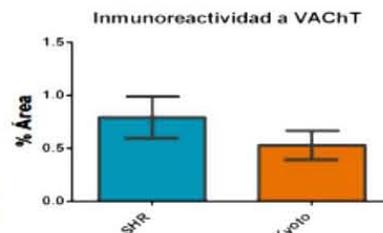
Fig.1 Inmuno-reactividad de GAD67 en el GCS de ratas Wky y SHR.



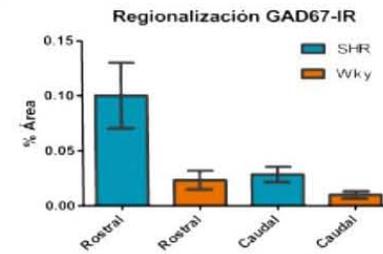
Se muestra un aumento de inmuno-reactividad a GAD67 en GCS de rata SHR (B) respecto a Wky (A). barra 20um. 40X



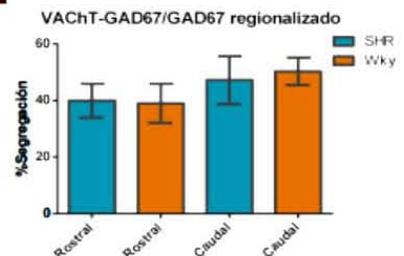
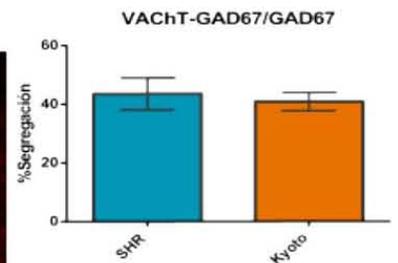
Presencia de GAD67 en SHR y su control. Se muestra una evidente diferencia en el área GAD67-IR en los GCS de ratas SHR respecto a Wky $p < 0.05$.



Presencia de VACHT entre SHR y su control. Porcentaje del área del GCS inmunopositiva a VACHT en ratas SHR y Wky $p > 0.05$



Se muestra que la GAD67-IR está regionalizada en el GCS de ratas SHR. El mayor porcentaje de reactividad se encontró en el área rostral $p < 0.05$



Se muestra que no hay diferencia en la segregación de GAD67 y VACHT en las neuronas simpáticas de ratas SHR y Wky. $p > 0.05$.

CONCLUSIONES



- Hay un aumento significativo en la GAD67-IR en rata SHR respecto a su control Wky. También hay una tendencia de aumento de VACHT
- La GAD67-IR está regionalizada en los GCS de la rata SHR.
- Estos resultados pueden ser debido a un intento de amortiguar la sobreactividad del SNS reportado en la hipertensión. La distribución con gradiente rostro-caudal es un resultado posible a que las neuronas que mandan sus eferencias por el nervio carotídeo interno (NCI) necesitan una mayor inhibición que las que envían por el nervio carotídeo externo (NCE) debido a los tejidos que están inervando en particular.

Banastank S, Dani Opin Pharmacol 2004; Ehsas D. Annual meeting of The Society for Neuroscience 2012; Morfin C, Cerri Biol. 1999; Sáenz C. Progress in Biology 2012; Vega A. Develop. Neurosci 2010; metastor@imgipgaph@biotech.com