



Universidad Autónoma Metropolitana  
Unidad Iztapalapa

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**EFFECTO DEL ESTRÉS CRÓNICO SOBRE  
ALTERACIONES METABÓLICAS Y SU ASOCIACIÓN  
CON ESTRÉS OXIDANTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

PRESENTA:

B. E. ANA LAURA LÓPEZ LÓPEZ

CO-DIRECTORES

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME.

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR.

ASESORES

DRA. MARÍA DEL CARMEN ESCOBAR VILLANUEVA

DR. GONZALO VÁZQUEZ PALACIOS

México D.F.

Diciembre 2011

## COMITÉ TUTORAL

### **Codirectora**

Dra. Herlinda Bonilla Jaime.  
Profesor Titular "C", T.C.  
Laboratorio de Farmacología Conductual y Reproductiva  
Departamento Biología de la Reproducción,  
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa.

### **Codirector**

Dr. Francisco Alarcón Aguilar.  
Profesor Titular "C" T.C.  
Laboratorio de Farmacología  
Departamento Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

### **Asesora**

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva.  
Profesor Titular "C", T.C.  
Laboratorio de Farmacología  
Departamento Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

### **Asesor**

Dr. Gonzalo Vázquez Palacios.  
Profesor Titular T.C.  
Colegio de Ciencia y Tecnología  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Este trabajo se realizó en el laboratorio de Farmacología del Departamento de Ciencias de la Salud y en el laboratorio de Farmacología Conductual y Reproductiva, del Departamento de Biología de la Reproducción, en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa bajo la dirección y asesoría de la doctora Herlinda Bonilla Jaime, el doctor Francisco Javier Alarcón Aguilar, la doctora Carmen Escobar Villanueva y el doctor Gonzalo Vázquez Palacios.

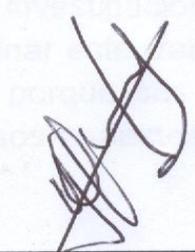
El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al programa Nacional de Posgrados de Excelencia del CONACyTn(PNPC) registro 001481 y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCyT 2003IMPTNNN0020.

Para la realización de los estudios de maestría la alumna Ana Laura López López contó con el apoyo de beca CONACyT mediante el número de registro de la beca 39046/CVU: 331183

## Miembros del jurado

Los miembros del jurado fueron designados por la comisión de posgrado de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, los abajo firmantes aprobaron la tesis titulada "Efecto del estrés crónico sobre alteraciones metabólicas y su asociación con estrés oxidante", con fecha de presentación para obtener el grado de Maestría el día 15 de diciembre del 2011.

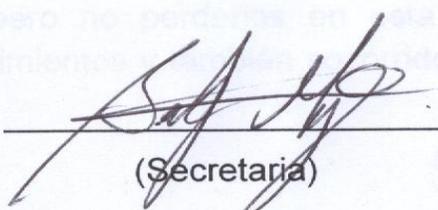
**Dr. Gonzalo Vázquez Palacios**  
Colegio de Ciencia y Tecnología  
Universidad Autónoma de la Ciudad de México  
San Lorenzo Tezonco



---

(Presidente)

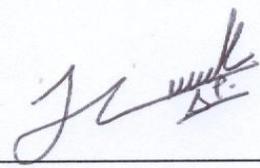
**Dra. Beatriz Gómez González**  
Área de neurociencias  
Departamento de Biología de la Reproducción  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa



---

(Secretaría)

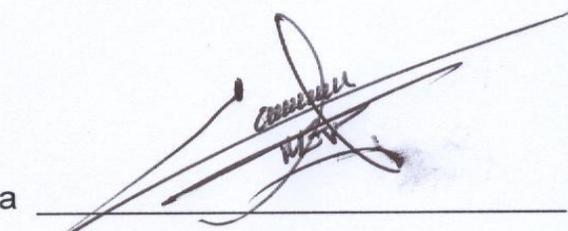
**Dr. Julio Cesar Almanza Pérez**  
Laboratorio de Farmacología  
Departamento Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa



---

(Vocal)

**Dra. María del Carmen Escobar Villanueva**  
Laboratorio de Farmacología  
Departamento Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa



---

(Vocal)

## AGRADECIMIENTOS

### **A Dios:**

Quien le da sentido a todo.

### **A los miembros de mi comité tutorial y a los sinodales**

De quienes he aprendido a consolidar mis métodos de investigación, mis guías profesionistas que creyeron en mis capacidades para terminar este trabajo. Gracias por darme la oportunidad de realizar una de mis metas, porque sus oportunos y certeros comentarios complementaron y mejoraron diversos aspectos teóricos de este trabajo.

### **A mis compañeros y amigos:**

Los mejores asesores del momento, aquellos que sin querer soportaron las evidencias inmediatas del desánimo, aquellos compañeros que alimentaron la esperanza de verme terminar y de quienes espero no perderlos en esta vida. Siéntanse de antemano invadidos por mis agradecimientos y también socorridos por mi alegría de ser parte de mi historia.

## DEDICATORIAS

### **A mi familia:**

Mis amigos involuntarios; a quienes admiro y de los cuales he aprendido a tener convicciones y a conseguir mis ideales. Mis mejores confidentes y con quienes día a día me complemento como persona.

Dedico este trabajo a todas aquellas personas que participaron directa e indirectamente en la realización de una de mis metas.

“Quien tiene un por que vivir, encuentra un como”

Nietzsche

## ***Resumen***

La respuesta del organismo ante un estresor se manifiesta mediante la activación del sistema simpático-adrenomedular y del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, que se traduce en un aumento en la liberación de adrenalina y glucocorticoides. La exposición crónica a estos mediadores produce una respuesta que altera el metabolismo celular de lípidos, proteínas y carbohidratos, y puede propiciar el desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas. Aunque la asociación entre estrés fisiológico y alteraciones metabólicas es comúnmente aceptada, los mecanismos de daño aún no han sido dilucidados y comprendidos. El propósito del presente trabajo fue determinar la participación del estrés oxidante, generado por el estrés fisiológico, en la generación de las alteraciones metabólicas inducidas por estrés. Utilizando el modelo de estrés crónico leve impredecible en ratas wistar, se evaluaron los efectos del estrés fisiológico sobre el peso corporal, tolerancia a la glucosa, niveles sanguíneos de colesterol y triglicéridos, a diferentes tiempos de inducción de estrés (20, 40 y 60 días). Así mismo se detectó la probable generación de estrés oxidante debido al estrés fisiológico mediante una evaluación cualitativa de la oxidación de proteínas. Por su parte para determinar la participación del estrés oxidante en la inducción de alteraciones metabólicas se evaluó la actividad de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa y catalasa) en diferentes órganos (hígado y páncreas) y tejido cerebral (hipotálamo, corteza prefrontal e hipocampo) a 20 y 40 días de exposición al estrés en las mismas ratas.

El modelo de estrés crónico leve impredecible consistió en someter a los animales a diferentes estresores, considerados como leves y aplicados de manera aleatoria. Los resultados mostraron que este tipo de estrés tiende a disminuir los niveles de triglicéridos a los 40 días, aunque induce pérdida de peso corporal a partir de los 50 días, sin alterar los niveles de colesterol. A los 40 y 60 días de estrés, las ratas desarrollaron intolerancia a la glucosa, mostrando una franca alteración en el metabolismo de carbohidratos, lo cual con el paso del tiempo podría promover el desarrollo de resistencia a la insulina. También se observó mayor cantidad de

oxidación de proteínas en corteza cerebral, hipocampo e hígado, mientras que en páncreas aumentó la oxidación de proteínas sólo a los 20 días de estrés. En este mismo periodo de tiempo, la actividad de la catalasa se incrementó significativamente en hipotálamo y disminuyó en hígado. Sin embargo, la actividad de la superóxido dismutasa solo mostró modificaciones significativas en páncreas con respecto a los tiempos de inducción de estrés. Estos resultados sugieren que el estrés crónico leve impredecible altera el metabolismo de carbohidratos y de triglicéridos, además de generar estrés oxidante. Este trabajo aporta evidencia sobre la participación del estrés oxidante en el desarrollo de alteraciones metabólicas.

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| <b>1.-Introducción</b>                                      | 1  |
| 1.1.- Concepto de estrés                                    | 1  |
| 1.2.- Estresor: Definición y clasificación                  | 2  |
| a) Estrés agudo   | 5  |
| b) Estrés crónico   | 5  |
| <b>2.-Mecanismos de respuesta al estrés</b>                 | 6  |
| 2.1.- Eje hipotálamo-hipófisis adrenal                      | 8  |
| 2.1.1.- Regulación del eje hipotálamo- hipófisis-adrenal    | 12 |
| 2.1.2.- Efecto de los glucocorticoides                      | 14 |
| 2.2.- Sistema nervioso simpático-adrenomedular              | 16 |
| 2.2.1.- Regulación del sistema simpático-adrenomedular      | 17 |
| 2.2.2.- Efecto de la adrenalina y noradrenalina             | 18 |
| <b>3.- Radicales libres y especies reactivas de oxígeno</b> | 19 |
| 3.1.- Fuentes generadoras de especies reactivas de oxígeno  | 21 |
| <b>4.-Estrés oxidante</b>                                   | 23 |
| <b>5.-Mecanismos antioxidantes de defensa celular</b>       | 24 |
| <b>6.- Modelos experimentales de estrés fisiológico</b>     | 27 |
| 6.1.- El modelo de estrés crónico leve impredecible         | 28 |
| <b>7.- Antecedentes</b>                                     | 29 |
| 7.1.- Efecto del estrés en el metabolismo                   | 29 |
| 7.2.- Efecto del estrés sobre el estrés oxidante            | 31 |

|  |    |
|--|----|
| <b>8.- Justificación</b>                                   | 34 |
| <b>9.-Objetivo general</b>                                 | 35 |
| 9.1.- Objetivos particulares                               | 35 |
| <b>10.- Hipótesis</b>                                      | 35 |
| <b>11.- Material y métodos</b>                             | 36 |
| 11.1.- Inducción del estrés fisiológico                    | 36 |
| 11.2.- Determinación de corticosterona                     | 39 |
| 11.3.- Determinación de pruebas de tolerancia a la glucosa | 39 |
| 11.4.- Determinación de triglicéridos y colesterol         | 40 |
| 11.5.- Análisis de tejidos                                 | 40 |
| 11.5.1.- Extracción de proteínas                           | 41 |
| 11.5.2.-Determinación del contenido de proteínas           | 41 |
| 11.5.3.- Determinación de oxidación de proteínas           | 41 |
| 11.5.4.- Determinación de actividad enzimática             | 43 |
| 11.6.- Análisis estadístico                                | 44 |
| <b>12.- Resultados</b>                                     | 46 |
| <b>13.- Discusión</b>                                      | 59 |
| <b>14.- Conclusiones</b>                                   | 71 |
| <b>15.- Bibliografía</b>                                   | 82 |

## **1.- Introducción**

### ***1.1.- Concepto de estrés***

A lo largo del tiempo se ha observado que la sobrevivencia de los organismos depende de su capacidad para adaptarse a los cambios del medio ambiente en el que se desarrollan. Así, observamos que el éxito evolutivo de los seres humanos se debe a la necesidad de una habituación constante, necesaria para la adaptación, el desarrollo y la supervivencia. Los mecanismos de respuesta al estrés tienen como objetivo restablecer la homeostasis y en consecuencia conseguir la sobrevivencia de los individuos ante agentes que amenazan o alteran su integridad.

La palabra estrés se utiliza en forma confusa y con múltiples significados. La respuesta fisiológica a un estímulo agresor suele denominarse estrés, mientras que al agente o factor que induce este estímulo se le llama estresor. Sin embargo, su definición también puede expresar la respuesta psicológica al estresor (Sandin, 2003). Así mismo, estrés puede referirse a las enfermedades ocasionadas por la exposición continua a diversos estresores. El primero en utilizar el término estrés fue Hans Selye (1936,1950), quien destacó la posible relación entre la respuesta fisiológica al estrés y las enfermedades asociadas. Selye definió al estrés como una respuesta no específica del organismo a cualquier estímulo nocivo que atente contra la homeostasis, y propone que la respuesta del organismo, que define como el Síndrome General de Adaptación, se presenta en tres etapas:

1. La reacción de alarma, que se presenta de manera inmediata al estresor, provoca la movilización de reservas del organismo para hacerle frente al estresor mediante la acción del sistema nervioso simpático adrenomedular, activando diversos sistemas para maximizar sus funciones y prepararlos para una respuesta de lucha o huida, primeramente propuesta por Cannon (1932).

2. La fase de resistencia se presenta cuando un individuo es sometido en forma prolongada a la amenaza de agentes lesivos físicos, químicos, biológicos o sociales. En este caso, el organismo puede manifestar un proceso de habituación a dichas demandas por un tiempo definido; durante esta fase suele ocurrir un equilibrio dinámico entre el medio ambiente interno y externo del individuo; sin embargo, esta capacidad puede verse influenciada por factores como la duración o el tipo de estresor, así como la edad del individuo. Si el organismo logra habituarse, esta etapa perdurará durante un tiempo prolongado.

La continuación de la respuesta producirá cambios fisiológicos y hormonales, dando inicio a la etapa de enfermedades de adaptación, en la cual la presencia continua del estresor puede causar úlceras pépticas, colitis ulcerosa, hipertensión, enfermedades cardiovasculares y cambios en el sistema inmune que favorecen la aparición de infecciones (Selye, 1950).

3. Finalmente, en la fase de agotamiento, la energía necesaria para la adaptación es limitada. La disminución progresiva del organismo frente a una situación de estrés prolongado conduce a un estado de gran deterioro con pérdida de

las capacidades fisiológicas, en el cual el sujeto suele sucumbir ante las demandas pues se reducen al mínimo sus capacidades de habituación, ocasionando un agotamiento físico que según Selye (1950), puede provocar la muerte del individuo.

El concepto estrés se ha sido rediseñado para distinguir entre "estrés" y la "respuesta de estrés". Se considera un factor de estrés o estresor como un estímulo que independientemente de su naturaleza (físico o mental) pone en peligro la homeostasis, mientras que la respuesta al estrés es la reacción que dicho estresor provoca en el organismo, encaminada a recuperar la homeostasis (Cannon, 1932, Chrousos, 2009), refiriéndose al proceso de homeostasis como el mantenimiento de una condición constante en el organismo (Cannon 1932). Por otro lado, otros investigadores como Levine y Ursin (1991) resaltan la idea de que el estrés debe ser considerado como un proceso que incluye el estímulo, la percepción del mismo, el procesamiento de la percepción, el comportamiento y las reacciones fisiológicas involucradas en dicho estímulo.

En la formulación del Síndrome General de Adaptación propuesto por Selye (1936, 1950) también se ha planteado la cuestión de la naturaleza de la habituación y de la mala habituación a la respuesta al estrés, destacando que el proceso de habituación de la respuesta al estrés se presenta después de la exposición prolongada a factores de estrés, y el organismo podría no llegar a una fase de agotamiento con consecuencias adversas. Los términos distrés y eustrés se introdujeron por Selye en 1976 para distinguir entre las consecuencias de la mala habituación y la buena habituación de la respuesta al estrés.

Por otro lado McEwen (2002) propone los términos alostasis y carga alostática para referirse a los procesos de habituación, en los cuales la alostasis se refiere a la respuesta aguda del organismo para mantener la homeostasis frente a un estresor, mientras que la carga alostática se refiere a la capacidad del organismo de tolerar el cambio causado por el estresor, por un periodo de tiempo (Goldstein y McEwen, 2002).

Aunque la formulación del concepto estrés ha causado controversia se llegó a la conclusión de que la respuesta al estrés depende de la intensidad, duración y calidad del estresor, así como de la consistencia fisiológica y emocional del individuo (McEwen y Wingfield, 2010; De Kloet *et al.*, 2005; Korte *et al.*, 2005; Dallman, 2007).

### **1.2.- Estresor: definición y clasificación**

Se denominan estresores a los estímulos que inducen la respuesta biológica y psicológica del estrés. Los estresores pueden clasificarse de acuerdo con la intensidad de esta respuesta, siendo leves, moderados y graves o excepcionales (traumáticos). Lo cual depende de la capacidad del sujeto para percibir las señales de aparición del estresor y poder anticiparse, para generar respuesta conductual y fisiológica con el fin de evitar o aminorar sus efectos, también pueden ser clasificados en predecibles e impredecibles. Considerando la duración del estresor se puede clasificar en:

- Estrés Agudo

Es el producto de un estímulo inesperado, ya sea físico o emocional, limitado en el tiempo que da lugar a una respuesta también intensa, rápida y algunas veces violenta. Se ha propuesto que la utilización del término agudo se limite a los casos en donde existe una exposición única ante una situación estresante y tiene un tiempo de duración de segundos a horas (Stanford y Salmon, 1993).

Los efectos de la respuesta al estrés agudo se atribuyen principalmente a las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), responsables de causar manifestaciones temporales como el aumento de la presión arterial y ritmo cardiaco, sudoración, mareos, migrañas, cambio de temperatura corporal, apnea, dolor torácico, elevación de los niveles de glucosa y triglicéridos en sangre y aumento del apetito (McEwen y Salposky, 2008); ansiedad, depresión, pérdida de sueño, falta de interés, molestias musculares en cuello, espalda y mandíbula que producen contracturas y lesiones en tendones y ligamentos. Además de causar problemas digestivos como el dolor en el estómago, acidez, flatulencia, diarrea, estreñimiento, colitis y síndrome del intestino irritable (McEwen y Salposky, 2008).

- Estrés crónico

Se produce por una exposición continua a factores estresantes externos o condiciones prolongadas de la respuesta al estrés (como en sujetos deprimidos y en estrés posttraumático). El tiempo de estas situaciones se presenta en un periodo de horas, semanas e incluso años. En estos casos el sujeto se ve expuesto

continuamente a las así llamadas hormonas del estrés (glucocorticoides y adrenalina), liberadas por las glándulas suprarrenales.

El estrés crónico incorpora varios elementos, entre los cuales se encuentran los cambios discretos en el medio ambiente, social o personal, del individuo, también llamados eventos de vida, que son a su vez externos y verificables; todos estos factores mantienen una sobreactivación crónica del eje hipotálamo hipófisis adrenal, que trae como consecuencia una inhibición del sistema de retroalimentación negativa (Johnson *et al.*, 1990).

La exposición del individuo ante los agentes estresantes durante meses o años, genera inicialmente alteraciones fisiológicas como trastornos gastrointestinales, colitis nerviosa, gastritis, hipertensión arterial, ansiedad, frustración, insomnio, migraña, agresividad entre otras (Stratakis y Chrousos, 1995), sin embargo la persistencia crónica produce finalmente serias alteraciones de carácter psicológico como disfunción familiar, conductas antisociales y depresión (Willner 1997); falla de órganos vitales e incluso el estrés crónico es considerado factor de riesgo para desarrollar enfermedades crónico degenerativas como la artritis reumatoide, el Alzheimer e incluso la diabetes mellitus (Stratakis y Chrousos, 1995; McEwen y Winfield, 2010).

## ***2.-Mecanismos de respuesta al estrés***

El organismo desarrolla distintas estrategias para adaptarse a los estímulos a que es sometido por su entorno, a través de cambios internos, entre los que destaca la

activación del sistema nervioso simpático adrenomedular y el eje hipotálamo hipófisis adrenal. El efecto de esta actividad desencadena la liberación de hormonas como adrenalina por la medula adrenal, mientras que a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal se estimula la liberación de cortisol y se disminuye la producción de dihidroepiandrosterona (DHEA) en las gónadas como respuesta espontánea (Johnson *et al.*, 1990; Stratakis y Chrousos, 1995); estas alteraciones no causan más que un desbalance momentáneo, sin embargo, a largo plazo causan efectos adversos sobre el organismo como: migraña, hipertensión, alteraciones en el sueño, cansancio, fatiga, depresión, urticaria, alteraciones en el peso o acné (Selye, 1976; Stratakis y Chrousos, 1995, Sandín, 2003).

El cerebro es un órgano clave en los procesos de integración de la respuesta al estrés, ya que se encarga de organizar la manera en la que los individuos hacen frente a situaciones estresantes mediante un sistema distribuido, coordinado y dinámico, que involucra niveles de organización neurobiológica: se encuentra el nivel cortico-límbico, en el cual se percibe al estresor a través de la corteza cerebral y se envía un mensaje al sistema límbico para integrar el estímulo percibido, en este nivel participa principalmente la amígdala y el hipocampo. En el hipotálamo se determina si el estímulo percibido es un estresor y se envía la respuesta a través de dos mecanismos: el hormonal y neural, (Figura 1).

La base esencial del mecanismo hormonal es la liberación de altas cantidades de glucocorticoides (GCs), principalmente cortisol (en humanos) o corticosterona (en roedores), por las glándulas adrenales, mediante la activación del eje hipotálamo-

hipófisis-adrenal. Por otro lado, el mecanismo neural actúa mediante neurotransmisores directa o indirectamente sobre el hipotálamo y, desde sus centros vegetativos, descienden los estímulos a través de los nervios esplénicos, llegando a la médula adrenal para inducir la liberación de noradrenalina y adrenalina (Stratakis y Chrousos, 1995; Gunnar y Quevedo, 2007).

### **2.1.- Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA)**

El principal centro modulador del eje HHA es el hipocampo, el cual regula de manera conjunta con el hipotálamo la respuesta al estrés, mediante el eje HHA (Figura 2), esta interacción representa el nexo entre el sistema nervioso central y el sistema endocrino. El hipotálamo está constituido por células neuroendocrinas y recibe señales mediante fibras aferentes de diferentes partes del cerebro, principalmente del hipocampo (Brown, 1994). Estas fibras pueden ser dopaminérgicas, noradrenérgicas, serotoninérgicas y GABA-érgicas, entre otras. El hipotálamo envía fibras eferentes a diferentes partes del cerebro, como la eminencia media y la neurohipófisis. A su vez, la neurohipófisis envía señales a la glándula adrenal (Johnson *et al.*, 1990; Singh *et al.*, 1999). El eje HHA se activa cuando las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan hormona liberadora de corticotropina (CRH) y arginina-vasopresina (AVP), estas hormonas se transportan a través de los capilares del sistema circulatorio portahipofisiario al órgano blanco, las células corticotróficas de la adenohipófisis (Souza y Grigoriadis, 1991; Brown, 1994; Stratakis y Chrousos, 1995; Gonzáles, 1999, Gunnar y Quevedo, 2007).

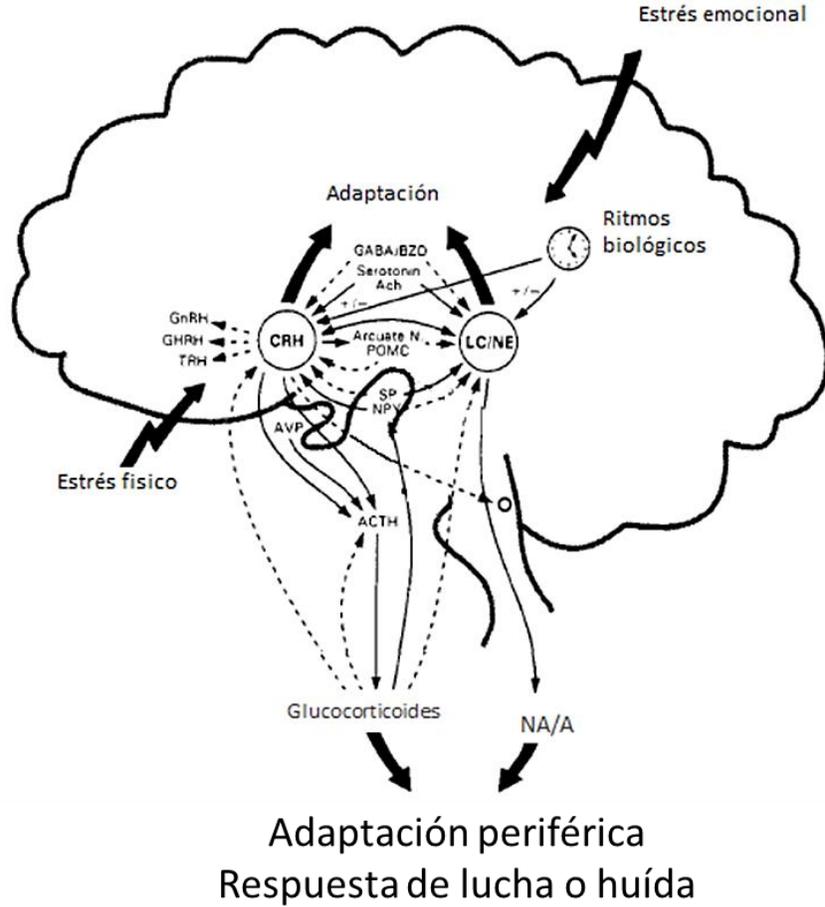


Figura 1. Representación de los componentes centrales y periféricos del sistema de respuesta al estrés, sus interrelaciones funcionales y con otros componentes del sistema nervioso central. Las flechas continuas representan una activación directa o indirecta. Las flechas punteadas o discontinuas representan una inhibición directa o indirecta. LC: Locus coeruleus. CRH: Hormona liberadora de corticotropina. NA: Noradrenalina; SP: Sustancia P. NPY: Neuropeptido Y. AVP: Arginina vasopresina. ACTH: Corticotropina. GnRH: Hormona liberadora de gonadotropina. GHRH: Hormona liberadora de la hormona de crecimiento. TRH: Hormona liberadora de tirotopina. Ach: Acetilcolina. 5HT: Serotonina. GABA/BZD: Ácido gamma aminobutírico/ benzodiacepina. POMC: propimelanocortina (modificado de Stratakis y Chrousos, 1995).

Cuando el hipotálamo libera CRH, ésta estimula la secreción y síntesis de la hormona adrenocorticotrófica o corticotropina (ACTH) en la hipófisis, que pasa al torrente sanguíneo y alcanza la corteza de las glándulas suprarrenales, cuyas partes fasciculada y reticular secretan glucocorticoides (GCs) en respuesta a la ACTH (Brown, 1994). Además de otras numerosas funciones, los GCs inhiben la síntesis y liberación de CRH y ACTH, regulando su propia liberación por un mecanismo de retroalimentación negativa (Johnson *et al.*, 1990; Brown, 1994; Andrews *et al.*, 2011).

Las glándulas adrenales se dividen en dos segmentos: la medula y la corteza, ambas regiones poseen funciones humorales pero responden a diferentes tiempos: la respuesta inmediata la lleva a cabo la medula adrenal, secretando adrenalina y norepinefrina. La respuesta tardía la lleva a cabo el eje HHA, a través de la corteza adrenal, resultando en la secreción de GCs (Singh *et al.*, 1999). Las glándulas suprarrenales desempeñan una amplia variedad de funciones fisiológicas, como la regulación de la glucosa sanguínea, recambio proteínico, metabolismo de lípidos, equilibrio de electrolitos y calcio (Stratakis y Chrousos, 1995) y, principalmente, la sobrevivencia ante cualquier tipo de estrés. Los organismos que se encuentran sometidos constantemente a estímulos estresantes mantienen la activación constante del eje HHA, incrementando la síntesis de CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo, causando la secreción de ACTH por la hipófisis anterior e induciendo un alto y constante nivel de cortisol (Reagan *et al.*, 2008).

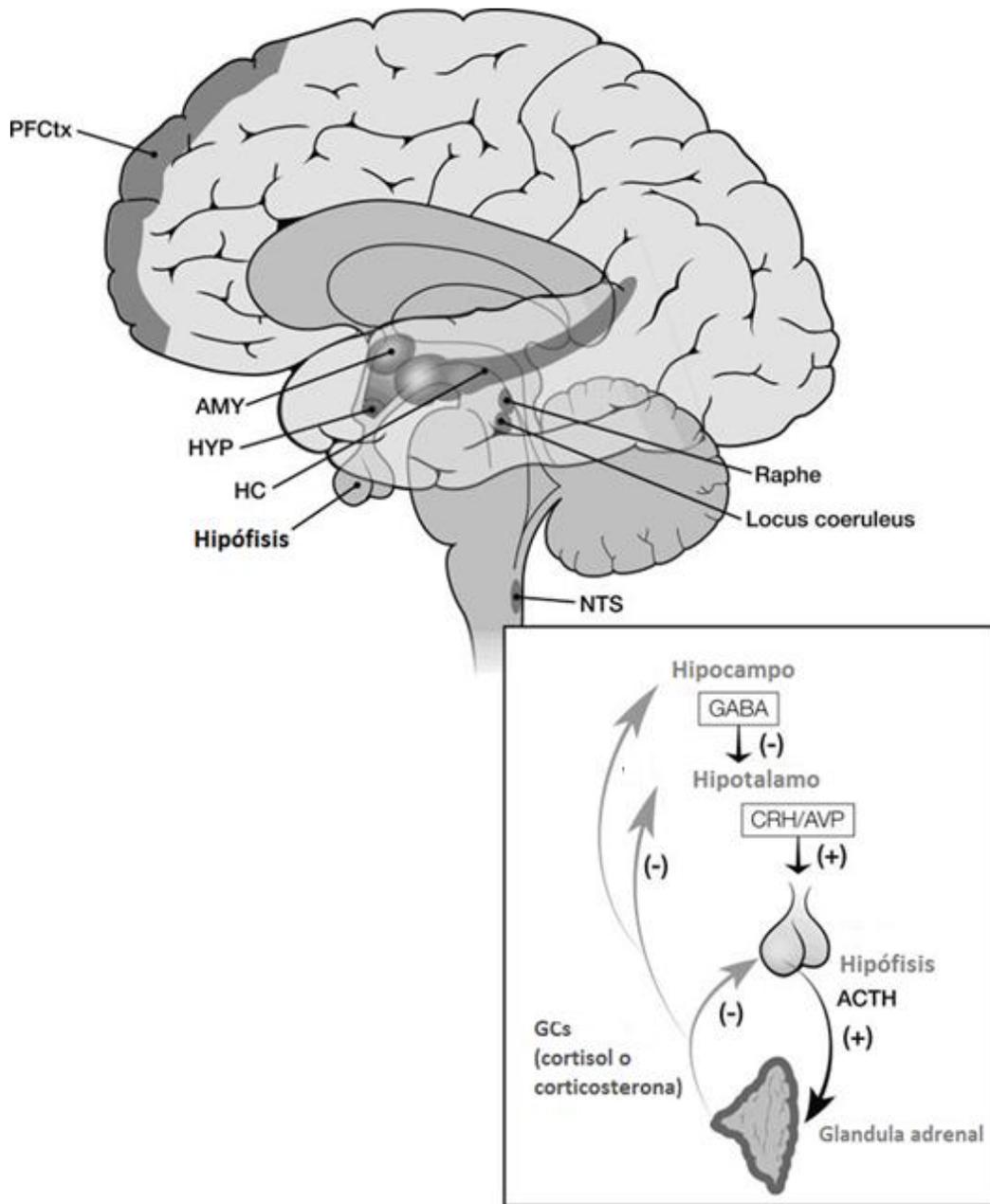


Figura 2. Anatomía del eje hipotálamo hipófisis adrenal HHA y las estructuras involucradas en su regulación. (+): Rutas de activación. (-): Rutas de inhibición. El incremento de los glucocorticoides (GCs) es iniciado por un aumento en circulación de CRH y AVP, proveniente de la región medial parvo celular en el núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo (HYP). La regulación por *feedback* negativo opera a través del aumento de GCs circulantes en hipocampo (HC), HYP e hipófisis. ACTH: Hormona adrenocorticotrópica. AMY: amígdala. GABA: Ácido gamma aminobutírico. NTS: núcleo del tracto solitario. PFctx: corteza prefrontal (modificado de Gunnar y Quevedo, 2007).

El estrés crónico altera el funcionamiento del eje HHA y se ha propuesto que esta alteración participa en la etiología y progresión de desórdenes neurales y un alto nivel de glucocorticoides circulantes (Reagan *et al*, 2008), que ejercen su acción afectando la regulación y expresión de genes que participan en el control del metabolismo (Chrousos, 2009).

### **2.1.1.- Regulación del eje hipotálamo hipófisis adrenal**

El sistema de respuesta al estrés requiere de una compleja coordinación neuroendocrina, entre el sistema nervioso central y la periferia. Los sistemas de regulación más importantes son el hipocampo-corteza cerebral y el sistema locus coeruleus-noradrenalina (Gunnar y Quevedo, 2007).

La producción de GCs por la corteza suprarrenal es posible debido a una cascada de eventos que comienza en el hipotálamo con la liberación de CRH y AVP por las células del núcleo paraventricular del hipotálamo. Una vez liberadas al sistema portahipofisario la CRH y AVP llegan a la hipófisis anterior o adenohipófisis en donde se libera y sintetiza ACTH (Brown, 1994).

La ACTH es un péptido de 39 aminoácidos que estimula la liberación y síntesis de cortisol, andrógenos suprarrenales y aldosterona. La ACTH se sintetiza a partir de la proopiomelanocortina (POMC), que también da lugar a la secreción de las  $\beta$  endorfinas. La ACTH interactúa con receptores membranales en la corteza de la glándula suprarrenal para estimular la producción y la liberación de GCs en la circulación general (Brown, 1994).

Al entrar los GCs en el citoplasma de las células interactúan con sus receptores (De Kloet *et al.*, 2005; Cosío y Adcock, 2005). Los receptores activados, se transportan al núcleo de la célula, donde interactúan con elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) y ejerce su acción al activar o reprimir genes, muchos de los cuales están implicados en funciones metabólicas vitales (Lodish *et al.*, 2005). Por lo tanto, el cortisol regula genes que codifican receptores a lipoproteínas, glucosa, lípidos y aminoácidos (De Kloet *et al.*, 2005), mientras que suprime los genes que codifican para la síntesis de CRH, POMC y citocinas antiinflamatorias (Cosío y Adcock, 2005). Es importante considerar que la actividad de los GCs es importante para la regulación del eje HHA y para la adecuada terminación de la respuesta de estrés, proporcionando retroalimentación negativa a nivel del hipotálamo y la hipófisis, así como en los centros cerebrales noradrenérgicos como el locus coeruleus (Figura 2).

Los GCs ejercen su efecto sobre los tejidos diana desde varios minutos hasta varias horas después de la exposición a un estresor (Sapolsky *et al.*, 2000; Gunnar y Quevedo, 2007). Desde el punto de vista evolutivo, la capacidad de autorregular y controlar la respuesta al estrés se considera importante para los procesos adaptativos, por lo que la inhibición del catabolismo, crecimiento, reproducción y los efectos inmunosupresores son transitorios y están dirigidos a favorecer la sobrevivencia (Kyrou y Tsigos, 2009). Sin embargo, la activación crónica del sistema puede provocar estragos en los individuos.

### **2.1.2.- Efecto de los glucocorticoides (GCs)**

Los glucocorticoides, específicamente el cortisol en ratas o cortisol en humanos, tienen un efecto importante en la movilización de glucosa, además contribuyen al aumento de la activación, la vigilancia, la atención y en procesos cognitivos, como la consolidación de la memoria (Hyroya *et al.*, 2010), así también inhiben el crecimiento, la actividad del sistema reproductivo y la contención de la respuesta inmune (Chrousos, 1995; 2009). Las acciones de los GCs se pueden clasificar de la siguiente forma:

1. Acciones permisivas: son ejercidas por los GCs presentes antes de la exposición a un estresor, preparan los mecanismos por los cuales un organismo responde al estrés.
2. Acciones supresoras: son las atribuibles al aumento de las concentraciones de GCs por el estrés y, por lo tanto, tienen un efecto tardío, aproximadamente una hora o más después del inicio de la respuesta al estrés. Estas acciones están encaminadas a frenar la respuesta.
3. Acciones estimulantes: son atribuidas al aumento de las concentraciones de GCs por efecto del estrés, con un inicio de alrededor de 1 hora o más después de la aparición del factor estresante. Los GCs potencian el efecto de las primeras hormonas liberadas en la respuesta al estrés (Salposky *et al.*, 2000).

Los GCs realizan sus acciones a través de la unión a un receptor citoplasmático específico (RG). Cuando la hormona se une al RG, se libera de sus interacciones

con las proteínas de choque térmico (hsp90 y hsp70) y esto induce un cambio en la conformación del receptor, que tiene como resultado la formación de dímeros, que se dirigen al núcleo celular, en donde se unirá al ADN a través del sitio reconocimiento del sitio de unión al ADN o GRE (Lodish *et al.*, 2005; De Kloet *et al.*, 2005; 2008).

Existen dos tipos de receptores a GCs: el receptor a mineralcorticoides (MR) y el receptor a glucocorticoides (GR) (De Kloet *et al.*, 2005; Gunnar y Quevedo, 2007).

El gen del receptor a GCs (RG) se encuentra en el brazo largo del cromosoma 5 (región 5q31-32); tiene una estructura genómica constituida por 9 exones y existen evidencias de 3 promotores distintos del gen (Cosío y Adcock, 2005). Aunque no está clara la razón del uso de diferentes promotores según el tipo celular, esta heterogeneidad podría estar relacionada con diferentes formas de regulación específicas del RG según el tipo celular.

El RG puede presentarse en 2 isoformas moleculares diferentes, el RG $\alpha$  y el RG $\beta$ , con 777 y 742 aminoácidos, respectivamente (Cosío y Adcock, 2005; De Kloet *et al.*, 2005). Ambas isoformas se encuentran juntas en casi todos los tejidos humanos. El RG $\alpha$  es la isoforma predominante y la única que tiene capacidad para unirse a la hormona y, por lo tanto, para realizar funciones de activación o represión. La RG $\beta$  se forma por un mecanismo alternativo de maduración (splacing o corte y empalme) del pre-RNA<sub>m</sub> del RG, y difiere de la isoforma  $\alpha$  tan sólo en los últimos aminoácidos del extremo C-terminal (Cosío y Adcock, 2005).

Fuera del cerebro, los GCs requieren de la presencia de la enzima 11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa ( $11\beta$ -HSD), que previene la unión de GCs al receptor. En el cerebro, donde la  $11\beta$ -HSD es mínimamente expresada, los GCs se unen al MR y al GR; teniendo mayor afinidad al receptor MR, lo que es fundamental en la regulación, tanto de las respuestas basales como del sistema HHA (Gunnar y Quevedo, 2007). Debido a sus afinidades diferenciales de GCs, el MR se encuentra ocupado de un 80% al 90% cuando los GCs se encuentran en rangos basales (De Kloet *et al.*, 2005).

La activación del MR se presenta preferencialmente para regular la producción circadiana de los GCs a través de un mecanismo de acción no genómico, mientras que la activación del GR se presenta bajo condiciones de estrés, y esto es mediado por un mecanismo genómico y no genómico (Venkataraman *et al.*, 2007).

## **2.2.- Sistema Nervioso Simpático-Adrenomedular (SAM)**

El sistema simpático-adrenomedular es un componente del sistema nervioso autónomo que regula la liberación de catecolaminas en la médula adrenal. El aumento de adrenalina circulante favorece la rápida movilización de los recursos metabólicos y la orquestación de la respuesta de lucha o huida (Cannon, 1932; Stratakis y Chrousos, 1995). El efecto de la adrenalina y noradrenalina es inmediato, mientras que los cambios en la expresión génica como consecuencia del efecto de los GCs, son más lentos o tardíos, además de que pueden continuar ejerciendo su efecto por períodos de tiempo más prolongados (De Kloet *et al.*, 2005).

La regulación tanto del SAM y HHA coincide en el Hipocampo-Hipotálamo, ambos integran funciones autonómicas y endocrinas con el comportamiento. Por otra parte, las entradas a los núcleos del hipotálamo que integran las respuestas del SAM y HHA a los estresores involucra vías cortico-límbicas (Chrousos, 2005; Gunnar y Quevedo, 2007).

### **2.2.1.-Regulación del Sistema Simpático Adrenomedular**

Las células cromafines que se encuentran en la médula suprarrenal son las secretoras y reguladoras de las funciones simpáticas posganglionares; se encuentran inervadas por las neuronas simpáticas preganglionares, que residen en la sustancia gris intermedio lateral de la médula espinal. Las neuronas simpáticas preganglionares envían axones a través de la raíz ventral de la médula espinal, formando una relación de sinapsis colinérgica con las células cromafines, a través de las cuales viaja un estímulo percibido como estresor. Cuando estas células son estimuladas por el nervio esplénico, secretan catecolaminas, principalmente adrenalina (80%) y noradrenalina (20%) (Gunnar y Quevedo, 2007).

La adrenalina y la noradrenalina se unen a los receptores adrenérgicos (alfa y beta) que se encuentran distribuidos en diferentes órganos diana; por lo tanto, participan en múltiples funciones, como el aumento de la frecuencia y actividad cardiovascular, aumentando la tasa y el volumen sistólico y provocando, subsecuentemente, vasodilatación en los músculos y la constricción de los vasos sanguíneos en la piel y

el intestino (Chrousos, 2005). Estos cambios garantizan el suministro de sangre y energía tanto al cerebro como a los músculos.

### **2.2.2.- Efecto de la adrenalina y noradrenalina**

Por otro lado, el efecto metabólico de la adrenalina es estimular la glucogenólisis en el hígado, moviliza reservas y da lugar al aumento de los niveles plasmáticos de glucosa, para proveer de un ambiente en el cual la glucosa se encuentre disponible para que el individuo pueda enfrentar el estresor. Aunque ni la adrenalina ni la noradrenalina cruzan la barrera hematoencefálica, las acciones periféricas de estas catecolaminas tienen su paralelo en el cerebro. El locus coeruleus es el principal productor de noradrenalina (Morilak, 2005; Gunnar y Quevedo, 2007; Chrousos, 2009), y es activado por el sistema límbico y el hipocampo; el papel de las catecolaminas en la respuesta a estresores es aumentar la vigilancia, la activación y la atención, además de potenciar la activación del eje HHA.

Además se ha propuesto que entre las acciones causadas por las catecolaminas y los glucocorticoides está la alteración en la producción de especies reactivas de oxígeno y las reacciones redox de la célula en la mitocondria consecuencia del incremento del metabolismo de glucosa (Hiroya *et al.*, 2010). Así mismo existe evidencia de que estresores repetitivos o crónicos promueven la formación de especies reactivas de oxígeno y condiciones de estrés oxidante (Kamper *et al.*, 2009).

### ***3.- Radicales libres y especies reactivas de oxígeno***

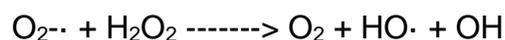
Los radicales libres se definen como especies químicas que tienen uno o más electrones desapareados en su última capa, por lo que son moléculas altamente reactivas que causan reacciones en cadena (Konigsberg, 2007).

Los radicales libres pueden ser derivados de oxígeno: especies reactivas del oxígeno (ERO) o especies reactivas del nitrógeno (ERN). Las ERO son radicales libres en donde el electrón desapareado se sitúa predominante sobre el átomo de oxígeno, habitualmente el oxígeno se encuentra en su forma más estable, la molécula diatómica  $O_2$ , presenta los electrones que forman parte del enlace  $\pi$  en el mismo espín (estado triplete). En esta forma el oxígeno es moderadamente reactivo. Sin embargo, por efecto de radiaciones ionizantes, por la acción de enzimas o por mecanismos puramente químicos, se pueden generar radicales libres capaces de reaccionar con otros compuestos presentes en el organismo y, consecuentemente, producir daño celular (Konigsberg, 2007).

El radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es la forma dominante del oxígeno a pH fisiológico. En el metabolismo aerobio entre 1% y 2% del consumo total de oxígeno da lugar a la formación del  $O_2^{\cdot-}$ . Es relativamente poco reactivo e inestable, pero potencialmente tóxico ya que a partir de éste se pueden originar otros intermediarios más reactivos. Tiene una vida media de algunos milisegundos y experimenta reacciones de dismutación, que consiste en la reacción entre dos radicales superóxido para generar el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno (Konigsberg, 2007). Por otro lado el  $H_2O_2$

no es un radical libre, pero su toxicidad es importante ya que atraviesa con facilidad las membranas celulares. Se convierte en agua por acción de la catalasa (CAT), un proceso que determina su vida media. Al parecer el  $H_2O_2$  está implicado en la regulación de la transducción de la señal de expresión de genes a través de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) y AP-1, capaces de inducir la transcripción de genes, tales como los genes para interleucina 2 (IL-2), factor de necrosis tumoral tipo  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad y C-fos (Sen y Packer, 1996).

El radical hidroxilo ( $OH^\bullet$ ) es la especie química más reactivas que se conoce y, por tanto, la más tóxica (Konigsberg, 2007). Tiene una vida media estimada de alrededor de  $10^{-9}$  segundos. Puede formarse *in vivo* como consecuencia de radiación de alta energía (rayos X o rayos  $\gamma$ ) que puede provocar la ruptura homolítica del agua corporal. El  $OH^\bullet$  también se puede formar como consecuencia de la reacción de Haber-Weiss:



Uno de los procesos más importantes de producción de  $OH^\bullet$  es la reducción del  $H_2O_2$  por ciertos iones metálicos. La reacción de Fenton utiliza  $Fe^{2+}$  y el  $H_2O_2$ :



Otros tipos de especies reactivas son: el radical alcoxilo ( $RO^\bullet$ ), que se puede formar durante la degradación de los lipoperóxidos en reacciones catalizadas por metales

pesados, y el radical peroxilo ( $\text{ROO}\cdot$ ), que es un producto intermedio de la lipoperoxidación (LPO) (Konigsberg, 2007).

### **3.1.- Fuentes generadoras de especies reactivas de oxígeno**

Los radicales libres pueden proceder de fuentes externas como parte de la ingesta alimentaria. Con la dieta y el estilo de vida se ingieren muchos compuestos de naturaleza prooxidante como, el humo de tabaco, bebidas alcohólicas y alimentos ricos en grasas que dan lugar a generación de radicales libres. Por otro lado, factores como la radiación ultravioleta (UV), la contaminación ambiental, el ozono, la exposición a sustancias tóxicas, entre otros, también son agentes externos que favorecen la formación de especies reactivas de oxígeno.

De manera endógena los radicales libres se forman en las células en numerosos procesos, tales como el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria, la activación de los leucocitos, reacciones enzimáticas (como la catalizada por la xantina oxidasa) y en el metabolismo de xenobióticos. Un compuesto se puede transformar en un radical libre de diferentes formas: ganando un electrón, perdiendo un electrón o por fusión homolítica simétrica de una unión covalente (Cheesman y Slater, 1998).

La mitocondria se ha propuesto como una de las principales fuentes generadoras de ERO a nivel celular, esto debido a que el oxígeno que se respira en el intercambio de gases en los pulmones, y que posteriormente es transportado por la hemoglobina de la sangre hasta llegar a las células, es utilizado como el aceptor final en la

respiración mitocondrial formando agua al interactuar con protones de la matriz mitocondrial, como un subproducto de la oxidación de la glucosa (Konigsberg, 2007). La contribución de cada sitio a la producción general de  $O_2^{\cdot-}$  varía del órgano, del tejido, y también del aumento de la actividad respiratoria de las mitocondrias (llamado estado III). El complejo III (ubiquinona-citocromo bc1) es el responsable de la mayor producción de  $O_2^{\cdot-}$  en las mitocondrias de corazón y pulmón; mientras que el complejo I (NADH deshidrogenasa) es aparentemente la fuente principal de este radical en el cerebro en condiciones normales (Toren y Nikki, 2000). Sin embargo, el complejo I también parece ser la fuente principal de radicales en una gran cantidad de patologías, que van desde la enfermedad de Parkinson hasta el envejecimiento (McCord y Turrens, 1994).

En las células de mamíferos las fuentes potenciales productoras de ERO incluyen la cadena transportadora de electrones mitocondrial y enzimas como la xantina oxidasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, hemooxigenasas, peroxidases, hemoproteínas tales como la hemotina y la hematina, y las NADH oxidasas. Una de las fuentes mejor caracterizadas de ERO es la NADPH (Babior, 2002). Este sistema enzimático utiliza NADH o NADPH como donadores de electrones para generar superóxido. Estas proteínas están asociadas a la membrana y se expresan en células endoteliales, células del músculo liso vascular, neutrófilos, monocitos y macrófagos (Sumimoto *et al.*, 2005). Los leucocitos polimorfonucleares constituyen una fuente importante de ERO cuando se activan por interleucinas, debido a que poseen en sus membranas la enzima NADPH oxidasa generadora de  $O_2^{\cdot-}$  que, en

presencia de hierro, se transforma en el  $\cdot\text{OH}$ , que es altamente tóxico. Este mecanismo, es común en los procesos inflamatorios (Babior *et al.*, 1973; McCord, 1974).

Otras fuentes productoras de ERO son los peroxisomas, organelos ubicados en el citosol, muy ricos en oxidasas y que potencialmente pueden generar  $\text{H}_2\text{O}_2$ , el cual es degradado por enzimas específicas, como la catalasa y la glutatión peroxidasa, transformándolo en agua y oxígeno molecular (Zangar *et al.*, 2004).

#### **4.-Estrés oxidante**

A nivel celular, el desbalance entre la producción de radicales libres y antioxidantes lleva a un estado de estrés oxidante, que provoca daño celular (Konigsberg, 2007). El daño puede ser ocasionado a nivel membranal, causado por el efecto de las especies reactivas en los lípidos de membrana; daño a proteínas y carbohidratos, lo cual causa alteración estructural y funcional; y daño al DNA, lo que provoca la inhibición o activación de respuestas celulares.

Para contrarrestar este daño el organismo cuenta con sistemas de defensa, cuyo principal objetivo es restablecer el equilibrio de los mecanismos oxidantes.

## **5.- Mecanismos antioxidantes de defensa celular**

Los mecanismos antioxidantes se explican por moléculas encargadas de neutralizar las reacciones producidas por los radicales libres (Konigsberg, 2007). Se pueden clasificar de acuerdo a su origen en: 1) antioxidantes exógenos, cuya fuente principal son los alimentos ricos en vitaminas y flavonoides que se ingieren en la dieta y 2) los antioxidantes endógenos, que conforman mecanismos internos de defensa, producidos internamente y que suelen clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos (Johansen *et al.*, 2005).

Entre los mecanismos enzimáticos se tienen a las enzimas: 1) súperóxido dismutasa (SOD), que convierte el  $O_2^{\cdot -}$  en  $H_2O_2$ ; 2) catalasa (CAT) y 3) glutatión peroxidasa (GSH px), que convierten al  $H_2O_2$  en agua en los lisosomas y las mitocondrias; estos sistemas antioxidantes disminuyen en ciertos procesos patológicos y bajo condiciones ambientales (como la contaminación atmosférica) así como con la edad. Por otro lado, como mecanismos no enzimáticos se tienen a las vitaminas A, C y E, glutatión reducido (GSH), ácido lipoíco, carotenoides, elementos traza como Cu, Zn y Se; coenzima  $Q_{10}$  y cofactores como ácido fólico, ácido úrico, albúmina, y vitaminas B1, B2, B6 y B12. El GSH es importante en la respuesta antioxidante producida por las células del organismo, especialmente glóbulos rojos. El GSH contribuye a mantener el poder antioxidante de enzimas como la GSHpx y también de la vitamina C y la vitamina E; en otras palabras, un descenso en la concentración de GSH implica una disminución en la capacidad antioxidante de las vitaminas C y E. Esta última previene la LPO (Johansen *et al.*, 2005).

Además, a los mecanismos enzimáticos se les suele clasificar en diferentes niveles:

Primer nivel:

Este nivel tiene por objetivo evitar la reducción univalente del oxígeno mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar su reducción tetravalente consecutiva sin liberar los intermediarios parcialmente reducidos. Esto lo logra con gran eficiencia el sistema citocromo-oxidasa de la cadena respiratoria mitocondrial, responsable de más del 90% de la reducción del oxígeno en el organismo humano (Tzu *et al.*, 2003).

Segundo nivel:

Constituye la primera fase de defensa enzimática antioxidante la SOD, descubierta por McCord y Fridovich (1969). Se trata de un grupo de metaloenzimas que se encuentran frecuentemente en organismos aeróbicos, aerotolerantes, esenciales para la defensa contra la toxicidad de los metabolitos parcialmente reducidos, durante la reducción biológica normal del oxígeno molecular. En mamíferos, existen tres tipos de enzimas que constituyen a la familia SOD. La primera es la enzima Cu/Zn-SOD (SOD1) localizada principalmente en el citosol, el núcleo y en la membrana externa de la mitocondria (Fridovich, 1978); la segunda enzima es la EC-SOD (SOD3), ubicada en fluidos extracelulares (Marklund, 1982); y la tercera enzima es la Mn-SOD (SOD2), la cual se concentra en la matriz mitocondrial y es inducida por el incremento en el estado oxidativo celular. Estas enzimas catalizan la conversión de  $O_2^{\cdot-}$ , en  $H_2O_2$  y  $O_2$  y controlan su concentración intracelular lo que

evita el daño al ADN, así como la oxidación de lípidos y proteínas que pueden resultar en la inactivación de ciertas enzimas (McCord y Fridovich, 1969).

Tercer nivel.

Está integrado por un grupo de enzimas especializadas en neutralizar el peróxido de hidrógeno. Entre ellas están:

a) Catalasa (CAT). Se encuentra ampliamente distribuida en el organismo, a nivel celular se localiza en: mitocondrias, peroxisomas y en el citosol de los eritrocitos. Forma parte del sistema antioxidante CAT/SOD que actúa en presencia de altas concentraciones de peróxido de hidrógeno (Hadju *et al.*,1977).

b) Glutación peroxidasa (GSH px). Se distribuye tanto en la mitocondria como en el citosol, principalmente en las células hepáticas, en los eritrocitos forma complejos con la hemoglobina y en los lisosomas de neutrófilos, macrófagos y otras células fagocíticas del sistema inmune (Gutiérrez, 2002). La GSH px es una enzima dependiente de selenio, su función es catalizar la reducción de peróxido de hidrógeno a lipoperóxido (L-OOH), utilizando como agente reductor el glutati6n reducido (GSH). Existen tres formas de GSH px:

- GSH px-c o forma celular: tiene mayor afinidad por el peróxido de hidrógeno que por lipoperóxido.
- GSH px –p o forma extracelular: presenta afinidad semejante para ambos sustratos.
- GSH px-PH: Tiene afinidad específica para los lipoperóxidos.

Las formas GSH px-c y GSH px-p no son capaces de utilizar los lipoperóxidos como sustrato (Ya y Diamont, 2003).

Para tratar de entender la asociación entre el estrés fisiológico y el daño inducido por estrés oxidante se han propuesto varios modelos animales que intentan reproducir situaciones estresantes a las que habitualmente se encuentra expuesto el ser humano.

### **6.-Modelos animales de estrés**

Los modelos animales de psicopatologías humanas buscan desarrollar síndromes en animales, en los que se reflejen aspectos de los trastornos a estudiar, como la depresión o el estrés (Bonilla *et al.*, 2000).

La exposición a situaciones de estrés, cuando se presenta de manera crónica, puede afectar profundamente el funcionamiento del SNC, provocando desórdenes en la conducta social y disfunción de habilidades cognitivas en la mayoría de los mamíferos, incluyendo al hombre. Es por ello que se han establecido modelos animales para estudiar los procesos desencadenados por la respuesta al estrés. Para esto se utilizan tanto los desafíos físicos como los sociales para crear situaciones de adversidad para el animal de experimentación. Existen diferentes tipos de modelos de inducción del estrés. Se encuentran los modelos predecibles, como son la inmovilización, el frío, la inmersión en agua fría y los choques eléctricos, en los cuales los animales son sometidos a un solo estresor de manera repetitiva por un periodo de tiempo no mayor a 20 días, debido a que los modelos repetitivos

suelen causar conductas de habituación en los animales. Otro tipo de modelos son los impredecibles, como el estrés crónico leve impredecible, en el cual se utiliza una serie de estresores que varían a lo largo del tiempo, lo que evita que los animales muestren habituación, permitiendo estudiar los efectos del estrés crónico en tiempos prolongados.

### **6.1.-Modelo de estrés crónico leve impredecible**

Uno de los modelos animales de estrés que pretende simular las condiciones de estrés a las que generalmente están expuestos los individuos en la sociedad, es el modelo animal de estrés crónico leve e impredecible. En el modelo de estrés impredecible, los animales son sometidos durante un periodo de tiempo prolongado a una serie de situaciones cambiantes, como puede ser la privación intermitente de agua y alimento, iluminación durante la noche, ruido e inclinación de la jaula, entre otros (Willner, 1992; 1997; Grippo, 2003; Marin *et al.*, 2006; Lucca *et al.*, 2008; 2009). Estos cambios en los estresores evita la adaptación que manifiesta el animal cuando se somete a un solo estresor durante un tiempo prolongado.

## **7.- Antecedentes**

### **7.1.- Efecto del estrés fisiológico sobre el metabolismo**

Durante la respuesta al estrés simultáneamente se suprimen funciones como la absorción intestinal, el crecimiento, la reproducción y el sistema inmune y se activan las vías neurales, que permiten al organismo afrontar mejor la situación estresante (Chrousos, 2009). Sin embargo, cuando el estrés se prolonga indefinidamente puede provocar consecuencias cardiovasculares, como hipertensión o arterosclerosis, comprometer el crecimiento y la reparación de tejidos, provocar ulcera péptica, suprimir la reproducción mediante disfunción eréctil o amenorrea, además de provocar consecuencias en el sistema inmune, lo que incrementa la susceptibilidad a infecciones y cáncer (Peters *et al.*, 2011), así como alteraciones metabólicas, como miopatías, fatiga u obesidad (Stratakis y Chrousos 1995; Salposky *et al.*, 2000; Sandín, 2007; Dallman 2007; McEwen y Winfield, 2010).

Entre otros efectos de los glucocorticoides se encuentra la inhibición de la hormona de crecimiento y la secreción de tirotropina, también llamada hormona estimulante de la tiroides (TSH), lo que altera la interacción con sus receptores en los tejidos diana. Además, los glucocorticoides favorecen la eliminación de 5´deiodinasa, que convierte la tetrayodotironina relativamente inactiva (T4) en triyodotironina (T3), lo que contribuye a la supresión de la reproducción y el crecimiento, en cuyos procesos se ve involucrado el metabolismo del calcio y las funciones tiroideas (Tsigos y Chrousos, 2002). Debido a que el estrés crónico se asocia con la presencia de

resistencia a la insulina, dislipidemia e hipertensión, también afecta directamente la actividad de la insulina, la función de los adipocitos y el sistema cardiovascular, se considera un factor generador de síndrome metabólico (Tsigos y Chrousos, 2002; Currie *et al.*, 2011).

No existe evidencia de que el estrés cause diabetes o síndrome metabólico o alguna otra patología, sin embargo debido a que la respuesta periférica al estrés involucra una elevación de glucosa desde los sitios de almacenaje a la circulación, el estrés es considerado como un factor de riesgo de enfermedades neurodegenerativas y metabólicas crónicas (Mitra, 2008). En el caso de los trastornos metabólicos, algunos estudios sugieren que las experiencias estresantes podrían afectar el inicio y/o el control metabólico de la diabetes, sin embargo, los resultados han sido poco concluyentes. En el siglo XVII, la aparición de la diabetes se relacionó con una prolongada tristeza. Desde entonces, una serie de investigaciones han identificado factores de estrés, como la pérdida de la familia y el estrés laboral, como elementos desencadenantes de la aparición de diabetes, tanto tipo 1 como tipo 2 (Lloyd *et al.*, 2005; Zavaskis y Wilson, 2011). A través de una encuesta y de la aplicación de la prueba de tolerancia a la glucosa, Mooy y colaboradores (2000) observaron una asociación entre las experiencias estresantes y el diagnóstico de la diabetes tipo 2. Por otro lado, Bjorntop (1997) argumentó que la activación del eje HHA por el estrés induce varias alteraciones endocrinas, con un incremento de cortisol que antagoniza la acción de la insulina. Al mismo tiempo, un aumento de adipocitos viscerales

(aumento en el perímetro) observado en la resistencia a la insulina representa un factor importante en el desarrollo de la diabetes.

Se ha propuesto una hipótesis en la que el estrés induce diabetes tipo 2 a través de los receptores de la CRH, proponiendo a la CRH como uno de los factores que podría vincular la vía de cortisol que subyace a la asociación clínica de la depresión y la diabetes tipo 2, aunque la asociación entre éstas patologías necesita continuar estudiándose (Gragnoli, 2011). Así, el estrés crónico altera el funcionamiento del eje HHA, por lo que se afecta la regulación y expresión de genes que participan en el control del metabolismo y en el manejo de energía, por otro lado, la sobreactivación de la mitocondria podría producir un desbalance entre las reacciones redox de la célula y la producción de EROs (Reagan, 2002; Hiroya *et al.*, 2010). Sin embargo, los mecanismos de daño que anteceden a estas patologías no son concluyentes.

## **7.2.- Efecto del estrés fisiológico sobre el estrés oxidante**

Estudios de estrés crónico en modelos de inmovilización, frío e inmersión en agua fría a 21 días de tratamiento son asociados con estrés oxidante en eritrocitos, hígado, riñón, corazón, cerebro, estómago y pulmón (Gumuslu y Sahin, 2007; Lucca *et al.*, 2009). Por otro lado, se tiene evidencia de que a niveles elevados de corticosterona reducen la neurogénesis (Warner y Duman, 2006), y favorecen la apoptosis neuronal en hipocampo, al disminuir la proliferación de células pluripotenciales, por lo que es común encontrar una reducción en el volumen

hipocampo (Zafir y Banu, 2009, Hiroya et al., 2010). Debido a esto, se propuso que los glucocorticoides podrían participar en el incremento del estrés oxidante observado en hipocampo y corteza cerebral (Bachis et al., 2008; Hiroya et al., 2010).

Por su parte, en el modelo de estrés crónico leve impredecible se encontró un incremento de la oxidación de proteínas en la corteza prefrontal, hipocampo, estriado y corteza, así como un aumento de LPO en cerebelo y estriado (Lucca et al., 2009). También se ha encontrado que el estrés oxidante contribuye a la degeneración neural del SNC, al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas, como esclerosis amiotrófica lateral, Alzheimer y Enfermedad de Parkinson (Gumuslu y Sahin, 2007; Lucca et al., 2009; Hiroya et al., 2010).

En particular, la sobreproducción de GCs ha sido relacionada con estrés oxidante, apoptosis y pérdida de los receptores a glucocorticoides en las células del Cuerno de Amigdalas 3 (CA3) del hipocampo, lo que perjudica el proceso de aprendizaje y la consolidación de la memoria (Hiroya et al., 2010). Así también, se han reportado alteraciones anatómicas en pacientes con diabetes mellitus (Roriz et al., 2009), predominantemente en regiones subcorticales, sin embargo la disfunción cognitiva causada por daño cerebral en condiciones de hiperglucemia no está dilucidada, por lo que hace falta buscar modelos experimentales que permitan estudiar los mecanismos de daño que anteceden desordenes neurales y/o metabólicos. A pesar de estos descubrimientos en el cerebro y otros órganos y tejidos, hasta ahora no hay evidencias experimentales de los niveles de antioxidantes y marcadores de estrés en el páncreas debido al estrés, un órgano muy involucrado en la patogénesis de

enfermedades metabólicas crónico degenerativas, como la diabetes mellitus tipo 2 y enfermedades neurodegenerativas.

## **8.- Justificación**

El estrés es uno de los problemas de salud más importantes de las sociedades modernas, ya que se ha asociado con el desarrollo de enfermedades de carácter crónico degenerativo, como artritis reumatoide, Alzheimer, diabetes mellitus y síndrome metabólico (Stratakis y Chrousos 1995; McEwen, 1998; Tsigos y Chrousos, 2002). Entre los mecanismos de daño se menciona la participación del estrés oxidante. Sin embargo, en particular los mecanismos de daño implicados en la generación de alteraciones metabólicas por estrés fisiológico han sido poco estudiados. En este trabajo se tuvo como propósito obtener evidencias experimentales que apoyen la idea de que el estrés crónico leve impredecible produce alteraciones metabólicas en ratas, a través del estrés oxidante generado en el modelo.

## **9.- Objetivo General**

Determinar si el estrés crónico leve impredecible induce alteraciones en marcadores metabólicos y en el estado antioxidante de tejidos de rata

### **9.1.-Objetivos Particulares**

- ▶ Determinar la variación temporal en los niveles de corticosterona en el modelo de estrés crónico leve impredecible.
- ▶ Demostrar que el estrés crónico leve impredecible afecta la tolerancia a la glucosa, la ganancia de peso corporal y produce dislipidemias.
- ▶ Evaluar la oxidación de proteínas en tejidos (hipotálamo, corteza prefrontal e hipocampo) y órganos (hígado y páncreas) de ratas sometidas a 20 y 40 días de estrés crónico leve impredecible
- ▶ Evaluar la actividad de enzimas antioxidantes (SOD y CAT) en los tejidos y órganos de ratas sometidas a 20 y 40 días de inducción de estrés crónico leve impredecible.

## **10.- Hipótesis**

Si el estrés crónico induce disfunción metabólica y estrés oxidante, entonces los animales sometidos a estrés crónico leve impredecible presentarán intolerancia a la glucosa, dislipidemias y alteración de la actividad de enzimas antioxidantes.

## **11.- Material y métodos**

Se utilizaron 30 ratas cepa Wistar de tres meses de edad, machos de 250 a 300 g, procedentes del bioterio de la UAM-Iztapalapa, mantenidas en condiciones estándar de laboratorio según la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, con un ciclo luz- oscuridad de 12 horas (9 am- 9pm) con agua y alimento (Harlan) *ad libitum*. Los animales fueron separados en grupos de cinco ratas, cada tiempo tuvo su propio control:

- a) Grupo control (GC) (n=15).
- b) Estrés crónico leve impredecible. Los animales se sometieron a diferentes estresores durante 20, 40 y 60 días (n=5 en cada tiempo).

### **11.1.- Inducción del estrés fisiológico**

Para la aplicación de estrés, las ratas fueron alojadas en un cuarto de observación con condiciones controladas de luz, temperatura y ventilación, con capacidad para manejar diferentes estresores. La fase de estrés consistió en la aplicación de estresores, con algunas modificaciones, de acuerdo con el protocolo descrito por Willner (Willner, 1992; 1997; Grippo, 2003; Marin *et al.*, 2006; Lucca *et al.*, 2009). Los estresores utilizados fueron: privación de comida (12 h), privación de agua (12 h), inmovilización (1-3 h), inmovilización más frío (a 4°C 1.5-2.5 h), inmersión en agua fría( 15°C por 15 min) , luz continua (24 h), aislamiento (2-3 días), objeto extraño (se colocaron pelotas de plástico de 10 cm de diámetro de 3-5 h), inclinación de la caja ( 40° por 5 h), hacinamiento(15 animales por caja de 8 a 24 h), cama mojada (5-24 h),

ruido ( 40 dB 3-5 h). Dichos estresores fueron aplicados de manera aleatoria, variando el estresor a lo largo de la semana, como se muestra en la Tabla 1. Esto con el propósito de evitar la habituación de los animales. Los estresores se aplicaron preferencialmente al inicio de la fase de luz, entre las 9 y las 11 AM.

La inmovilización consistió en introducir a las ratas en un tubo de PVC de 5 cm de diámetro y 16 cm de largo, con una malla de alambre en cada extremo, uno de los cuales tiene un orificio de salida para la cola de la rata.

La inmersión en agua fría consistió en introducir a las ratas en una caja con 15 cm de agua, a una temperatura de 15°C durante 15 min, en donde podía nadar o permanecer en posición erguida, manteniendo la cabeza fuera del nivel del agua.

Durante el tiempo de aplicación del estrés se hizo el seguimiento del peso de los animales cada cinco días, los animales del grupo control fueron manipulados sólo durante la medición del peso.

Los animales se sacrificaron un día después de finalizar el procedimiento de estrés, para descartar el efecto del estrés agudo. El sacrificio fue por decapitación, se colectó la sangre y se extrajeron los tejidos y órganos para el procesamiento y análisis de las muestras. El suero se obtuvo por centrifugación de la sangre a 524 x g durante 10 min. Se hicieron alícuotas y las muestras se almacenaron a -70°C hasta el análisis bioquímico y/o de corticosterona.

| Domingo                               | Lunes                                     | Martes  | Miércoles   | Jueves                                  | Viernes                                | Sábado                                   |
|---------------------------------------|---|---|---|---|--|--|
|                                       |   |   |   | -----1<br>Privación de alimento<br>12 h | -----2<br>Inmovilización + Frio<br>2 h | -----3<br>Luz continua                   |
| -----4<br>Luz continua                | -----5<br>Privación de agua 12 h          | -----6<br>Cama mojada<br>8 h                  | -----7  | -----8<br>Inmovilización<br>2 h         | ---9<br>Luz continua                   | ----10<br>Aislamiento                    |
| ----11                                | ----12<br>Privación de agua /luz continua | ----13<br>Inmovilización<br>2 h               | -----14<br>Aislamiento                            | ----15<br>Aislamiento+ ruido 3 h        | ----16<br>Aislamiento                  | ----17<br>Privación de agua<br>12 h      |
| ----18<br>Inmersión en agua<br>15 min | -----19<br>Privación de agua<br>12 h      | -----20<br>Privación de alimento<br>12 h      | -----21<br>Sacrificio<br>20d/Luz continua         | -----22<br>Inmovilización + frio<br>2 h | ----23<br>Privación de agua            | -----24<br>Aislamiento                   |
| ----25<br>Aislamiento                 | -----26<br>Hacinamiento<br>8 h            | -----27<br>Luz continua                       | ----28<br>Privación de alimento                   | -----29<br>Inmersión en agua fría       | -----30<br>Ruido<br>3 h                | ----31<br>Inmovilización + frio<br>2.5 h |
| ----32<br>Luz continua                | -----33<br>Privación de alimento          | ----34<br>Cama mojada/privación de agua       | -----35<br>Aislamiento                            | -----36<br>Objeto extraño<br>4 h        | -----37<br>Inclinación de la caja      | ----38<br>Privación de agua              |
| ----39<br>Inmersión<br>15 min         | ---40<br>Privación de alimento            | -----41<br>Sacrificar 40<br>Privación de agua | -----42<br>Luz continua                           | -----43                                 | -----44<br>Ruido<br>3 h                | -----45<br>Aislamiento                   |
| -----46<br>Privación de agua          | -----47<br>Inmovilización + Frio          | -----48<br>Objeto extraño + Ruido<br>5 h      | -----49<br>Inclinación de la caja/<br>cama mojada | -----50<br>Priv. alimento hacinamiento  | -----51<br>Ruido<br>5 h                | -----52<br>Privación de agua<br>8 h      |
| -----53<br>Luz continua               | -----54<br>Ruido<br>5 h                   | -----55<br>Inmovilización + frio              | -----56<br>Cama mojada                            | -----57<br>Cama mojada                  | -----58<br>Ruido + aislamiento         | -----59<br>Inmersión en agua fría        |
| -----60<br>Privación alimento         | Sacrificio 60d                            |   |   |   |  |  |

Tabla 1. Protocolo del estrés crónico leve impredecible aplicado a ratas Wistar macho de tres meses de edad durante 20, 40 y 60 días.

### **11.2.-Determinación de corticosterona**

Para la determinación de corticosterona los animales fueron sacrificados entre las 10 y 11 AM (a una hora del inicio de la fase de luz); la determinación de corticosterona se realizó en suero, previamente almacenado, con un Kit comercial de ELISA (ALPCO immunoassays). La densidad óptica se determinó fotométricamente a 450 nm.

### **11.3.- Prueba de tolerancia a la glucosa oral (PTGO)**

Se realizaron PTGO a los 20, 40 y 60 días de inducción del estrés crónico leve impredecible. La prueba se realizó en los animales con 12 horas de ayuno y consistió en administrar por vía intragástrica una dosis de dextrosa (2 g/kg de peso), realizando mediciones de glucosa, desde la administración de la carga de dextrosa ( $t=0$ ) y a los 30, 60, 90 y 120 minutos. La medición de glucosa se realizó obteniendo muestras sanguíneas de la vena caudal, las muestras fueron colocadas sobre tiras reactivas y la medición de glucosa se realizó por el método de la glucosa deshidrogenasa (Accu-chek, Performa. Roche). En presencia de la coenzima (PQQ), la enzima de la tira reactiva, glucosa deshidrogenasa, convierte la glucosa de la muestra de sangre en gluconolactona, esta reacción crea una corriente eléctrica que el medidor traduce en un valor de glucemia.

#### **11.4.- Determinación de colesterol y triglicéridos**

Se midieron los niveles séricos de colesterol y triglicéridos, de las ratas sometidas a 20, 40 y 60 días de estrés crónico leve e impredecible utilizando el sistema, Reflotron (Bayer).

En la medición de colesterol se administraron 30  $\mu$ L de suero al área de aplicación de la tira reactiva. Los ésteres de colesterol son desdoblados con el correspondiente ácido graso y colesterol, el cual en presencia de oxígeno se oxida en colesteno, formando simultáneamente peróxido de hidrógeno. Este se oxida bajo el efecto catalítico de la enzima peroxidasa, formando un colorante azul que es proporcional a la concentración de colesterol de la muestra.

Los triglicéridos, que son determinados con una tira reactiva similar, son desdoblados en una reacción enzimática, en la que a través de distintas fases de reacción se produce la formación de peróxido de hidrógeno, que es oxidado por acción de la peroxidasa un indicador redox en un colorante azul, que es proporcional

#### **11.5.- Análisis de tejidos**

Después de remover todo el tejido cerebral (hipotálamo, hipocampo y corteza prefrontal), también se obtuvo hígado y páncreas. Las estructuras cerebrales y los órganos fueron lavados en solución salina a 4°C, y fueron cuidadosamente colocados en 600  $\mu$ L de buffer de fosfatos 0.067 M a pH7.8 y un *stock* inhibidor de proteasas. Estas muestras se almacenaron a -70°C hasta su utilización.

### 11.5.1.- Extracción de proteínas

La extracción de la proteínas total se realizó al homogenizar el tejido utilizando 0.6 ml de buffer de fosfatos pH 7 y 80  $\mu$ l de un *stock* inhibidor de proteasas Complete (Roche, Indianápolis, IN). El homogenado tisular fue resuspendido tres veces y se dejó reposar 5 min a 4°C. Después fue centrifugado a 164 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante conteniendo la proteína citoplasmática fue colocado en pequeños volúmenes y almacenado a -70°C.

### 11.5.2.- Determinación del contenido de proteínas

El contenido de proteínas en las muestras se realizó por el método de Bradford (1976), con el reactivo BioRad. Se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l de las muestras y se le adicionó 2.5 ml del reactivo de Bradford (1:4) se incubaron durante 20 min a 25°C. La cuantificación se realizó con una curva patrón de albúmina sérica bovina en un rango de 0.1-0.5 mg/ml. Posteriormente la absorbancia fue medida a 595 nm.

### 11.5.3.-Determinación de oxidación de proteínas: Análisis por OxiBlot

El ensayo de OxiBlot fue utilizado como un método indirecto para evaluar el estrés oxidante de las proteínas totales del tejido. Se realizó de acuerdo con el método descrito por Preston y colaboradores (1996), el cual se basa en la identificación de la proteína oxidada citoplásmica por medio de la unión específica con el anticuerpo primario y el reconocimiento de este anticuerpo por un segundo anticuerpo que lleva una marca fluorescente para mostrar que se encuentra presente.

Se tomaron 25  $\mu$ g de la proteína total, la cual fue derivatizada con dinitrofenil hidrazina siguiendo el protocolo del OxiBlot (Chemicon Internacional, Temecula, CA), un kit comercial que determina proteínas oxidadas. Las muestras fueron colocadas en geles de acrilamida-bisacrilamida (29:1, Sigma) al 12% en un amortiguador formado por Tris HCl 1.5 M pH 8.8, SDS al 10%, persulfato de amonio 10% y 5  $\mu$ l de TEMED. Después, las muestras se dejaron correr en una cámara de electroforesis (mini-Protean II, Bio-Rad) con un amortiguador de corrida pH 8.3, formado por Tris-Base, glicina y SDS durante 4 horas a 70 volts a 25°C. La proteína se transfirió a una membrana de difloruro de polivinilideno (PVDF) polyscreen (NEN), usando un amortiguador de transferencia pH 8.3 formado por Tris-Base 25 mM, glicina 192 mM, SDS al 0.05% y metanol al 20%, durante 14 horas a 30 volts y 25°C. Después la membrana fue bloqueada con una solución de leche descremada al 5% en amortiguador TBS-Tween20 a pH 7.5, formado por NaCl 150 mM, Tris-HCl 20 mM y Tween 20 al 0.1%, por 30 min dos veces. La membrana fue lavada con TBS-Tween20 dos veces y se le adicionó el anticuerpo primario que reconoce a la proteína derivatizada 1:500 (Anti-DNP; Kit OxyBlot™) por 1 h. Posteriormente fue lavada por duplicado con TBS-Tween20 y suplementado con leche durante 10 min. Posteriormente se realizaron otros dos lavados con TBS-Tween20 durante 5 min y después se le agregó el anticuerpo secundario acoplado a una marca fluorescente (anti-conejo IgG; OxyBlot™) 1:10000 por 1 h. La membrana se lavó con TBS-Tween20 durante 10 min, por triplicado y 5 min con TBS. Finalmente la membrana

fue tratada con el Ensayo SuperSignal<sup>®</sup> West Pico Substrate (Pierce, Rockford, IL) durante 10 min y fue expuesta en una placa radiográfica (Kodak).

Para la presentación de datos se realizó un análisis de densidad óptica a las imágenes obtenidas, con el programa ImageJ versión 1.45, los resultados se expresaron con porcentaje de aumento o disminución de proteínas oxidadas a 20 y 40 días de inducción de estrés crónico leve impredecible.

#### 11.5.4.- Determinación de la actividad enzimática

De la fracción citosólica se tomaron alícuotas para las determinaciones enzimáticas de SOD y CAT.

##### **SOD.**

La actividad de la SOD se determinó por el método de Winterbourn (1975), el cual se basa en la habilidad de esta enzima para inhibir la reducción del tetrazolio nitro-azul (NBT) por superóxido, el cual es generado por la reacción de foto-reducción de riboflavina y oxígeno. En una serie de tubos se preparó la mezcla de reacción, formada por 0.1 a 10  $\mu$ g de enzima (fracción citosólica), 0.2 ml de ácido etilendiamotetracético (EDTA) 0.1 M, conteniendo cianuro de sodio 0.3 mM, 0.1 ml de NBT 1.5 mM y buffer de fosfatos 0.067 M a pH 7.8, en un volumen final de 3 ml. Los tubos se colocaron en una caja con las siguientes medidas (60 x 15 x 20 cm), la cual contenía tres lámparas fluorescentes de 20 W por un período de 10 min. Pasado ese tiempo se le agregó 0.05 ml de riboflavina 0.12 mM y se incubó en la misma caja por 20 min. Las muestras se leyeron a 560 nm.

Se determinó el porcentaje de inhibición de la reducción de NBT para determinar los  $\mu\text{g}$  de enzima que correspondían a la mitad de la máxima inhibición. La actividad de la enzima se determinó por la siguiente relación:

$$\text{Unidades x mg de proteína} = \frac{1000}{\mu\text{g enzima resultado de la } \frac{1}{2} \text{ de la máxima inhibición}}$$

### **CAT**

La actividad de la enzima CAT se determinó por el método de Beers y Sizer (1952), el cual se basa en la desaparición del peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) utilizado por la catalasa. Se tomó 0.1 ml de la fracción citosólica y se le adicionó 1.9 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, 1 ml de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.059 M en 0.05 M de buffer de fosfatos a pH 7. Las muestras fueron leídas a una longitud de 240 nm a  $25^\circ\text{C}$  cada minuto y la actividad fue medida por la disminución de la absorbancia. La actividad de la enzima catalasa se expresó como mU por mg de proteína por min.

### **11.6.- Análisis Estadístico**

Los resultados se analizaron estadísticamente calculando el promedio aritmético, se graficó la media  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). La diferencia entre el peso corporal de los animales control y los estresados fue comparada con la prueba de t de Student con una  $p < 0.05$ , además se realizó una comparación entre la pendiente del grupo estrés con el grupo control. Para la diferencia entre los distintos tiempos de estrés, con respecto al grupo control, se realizó un análisis de varianza (ANOVA),

usando como prueba Post-hoc Tukey-Kramer con una  $p < 0.05$ . Los datos fueron analizados utilizando el programa estadístico NCSS (Number Cruncher Statistical System).

## **12.- Resultados**

- Efecto del estrés crónico leve impredecible sobre los niveles séricos de corticosterona.

Los niveles séricos de corticosterona se determinaron a los 20, 40 y 60 días de exposición al estrés. Los niveles de corticosterona en el grupo control se observan de  $0.89 \pm 0.08$   $\mu\text{g/dL}$  a 1 hora del inicio de la fase de luz. Mientras que a los 20 días presenta niveles de  $1.98 \pm 0.19$   $\mu\text{g/dL}$ , a los 40 días  $2.15 \pm 0.29$   $\mu\text{g/dL}$  y a los 60 días  $1.99 \pm 0.24$   $\mu\text{g/dL}$ , las concentraciones séricas incrementaron el 100% desde los 20 hasta los 60 días [ $F(3,29)= 8.7$ ,  $p<0.0003$ ] en los animales expuestos al estrés crónico leve e impredecible, como se observa en la figura 3.

- Efecto del estrés crónico leve impredecible en la tolerancia a la glucosa

La tolerancia a la glucosa se evaluó cada 20 días a los mismos animales para darle seguimiento al manejo de carbohidratos. En la Figura 4 se muestra que el grupo control presentó una glucosa basal de  $74.72 \pm 3.0$   $\text{mg/dL}$ , con un pico hiperglucémico de  $133.06 \pm 7.9$   $\text{mg/dL}$  al minuto 60 después de la administración de glucosa. Esta concentración fue en descenso, alcanzando un valor de  $119 \pm 5.7$   $\text{mg/dL}$  a los 90 min y de  $97.63 \pm 2.7$   $\text{mg/dL}$  a los 120 minutos. Ningunos de los grupos experimentales expuestos al estrés mostraron diferencias significativas en la glucosa basal.

El grupo de 20 días de estrés mostró un comportamiento similar al del grupo control, sin embargo, a partir del día 40 de estrés, se observó una alteración en la prueba de tolerancia a la glucosa, manifestándose un aumento en el pico hiperglucémico que

## Niveles de corticosterona

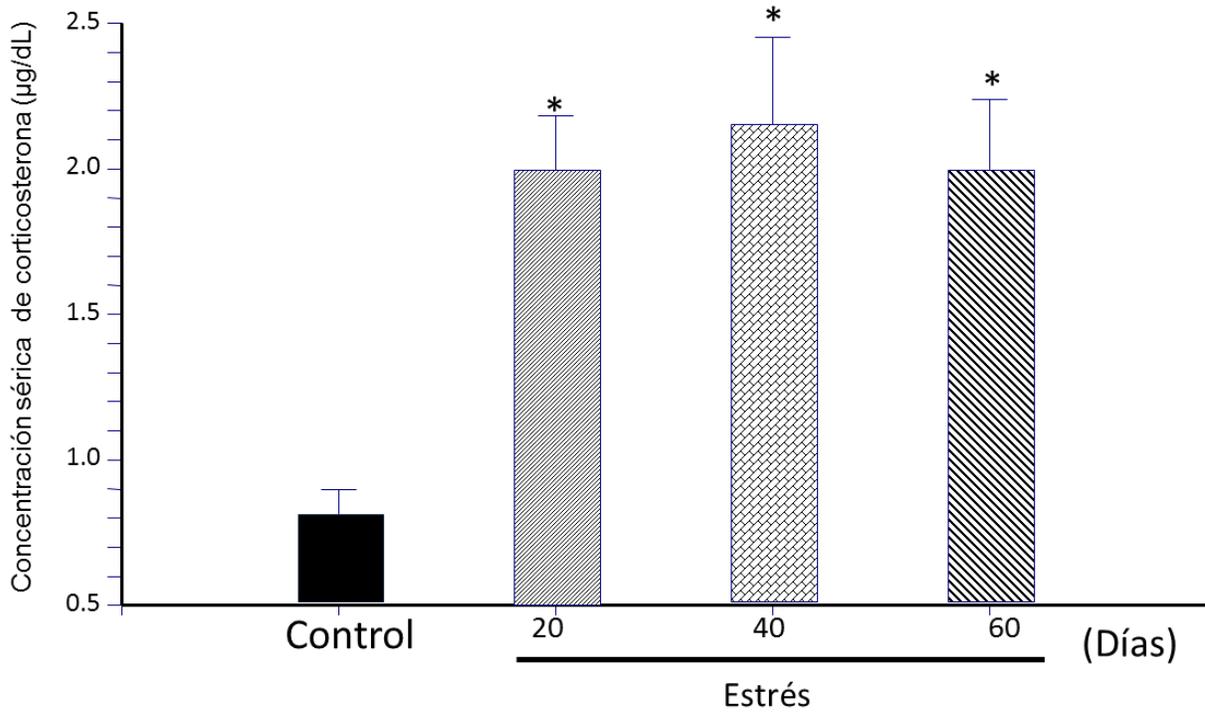


Figura 3.- Concentración sérica de corticosterona, el modelo de estrés crónico leve impredecible provocó aumento significativo de los niveles de corticosterona a los 20, 40 y 60 días de inducción de estrés crónico. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM. ANOVA, Tukey,  $p < 0.01$  ( $n=5$ ). \* Diferencia significativa con respecto al control.

alcanza una concentración de  $161 \pm 9.05$  mg/dL a los 60 minutos y una disminución al tiempo 120 minutos de  $118 \pm 3.05$  mg/dL, ambas mediciones significativamente más altas con respecto al grupo control. Este efecto se observa más pronunciado a los 60 días de estrés, en donde se refleja un completo descontrol en el manejo de carbohidratos, al mostrar niveles glucosa de  $142.4 \pm 8.41$  mg/dL 30 minutos después de la carga de glucosa y  $137 \pm 7.3$  mg/dL a los 120 minutos ( $p < 0.05$ ), lo cual muestra diferencias significativas con respecto al control.

➤ Efecto del estrés crónico leve impredecible sobre el peso corporal

El peso de los animales se registró cada cinco días a lo largo de los 60 días del estudio, antes de la aplicación de los estresores (Figura 5). En el grupo control se observa una ganancia de peso conforme transcurren los días con una pendiente de 0.7291, mientras que el grupo sometido a estrés mostró un patrón similar en la ganancia de peso hasta los 40 días de estrés; sin embargo, a partir de los 50 días de inducción de estrés crónico leve impredecible, se observa una pérdida de peso en comparación con el grupo control (t de Student,  $p < 0.05$ ), con una pendiente significativamente diferente (0.1472) en el grupo de estrés.

## Prueba de tolerancia a la Glucosa

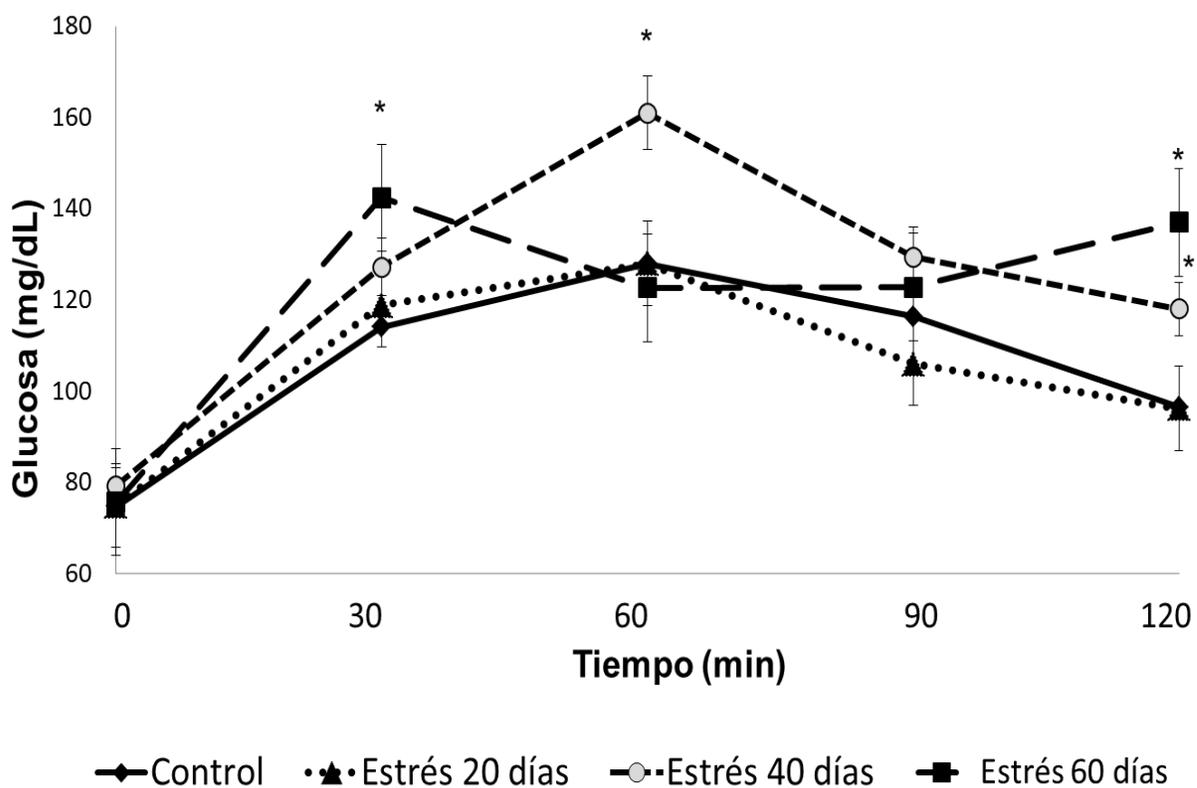


Figura 4.- Efecto del estrés crónico leve impredecible a diferentes tiempos en la prueba tolerancia a la glucosa. Media  $\pm$  EEM. ANOVA, Tukey  $p < 0.05$ .

\* Diferencia significativa con respecto al control.

## Peso corporal

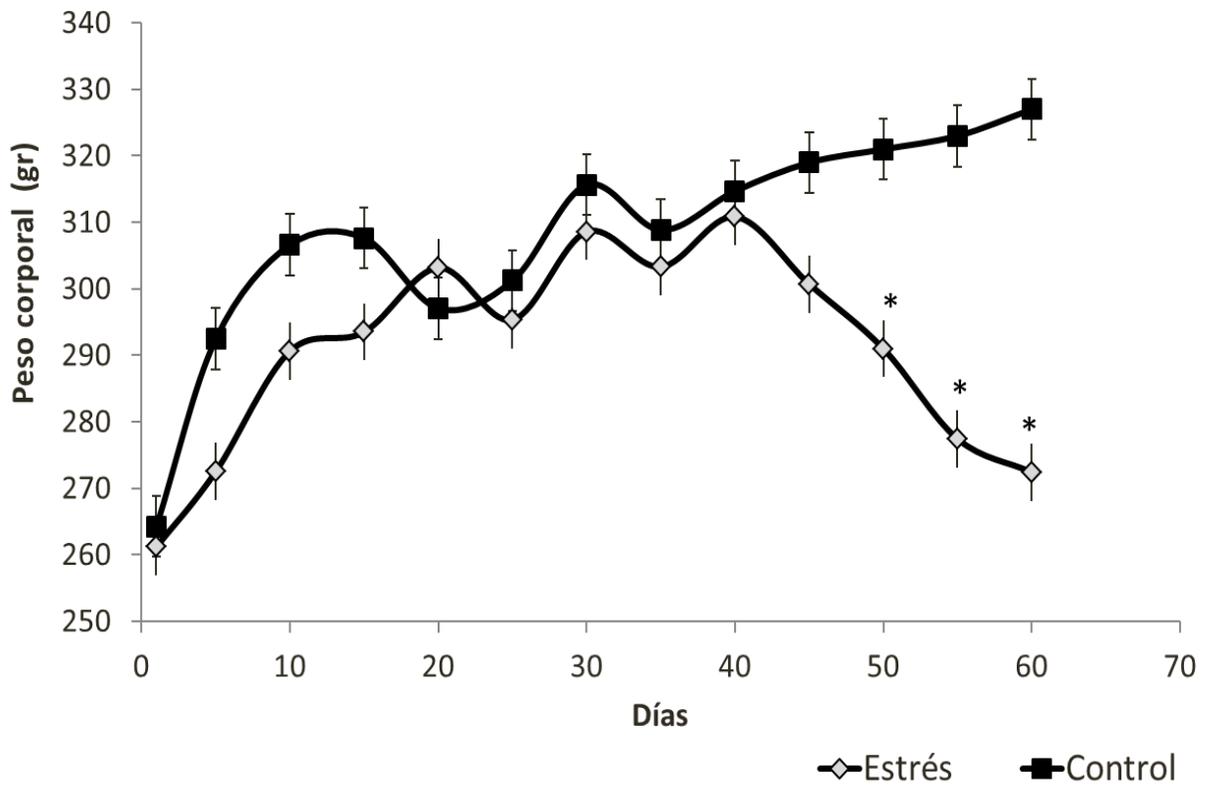


Figura 5.- Curso temporal del peso corporal de ratas sometidas a 60 días de estrés crónico leve impredecible, se observa que el comportamiento en la ganancia de peso fue diferente en el grupo con estrés, sobre todo después de los 40 días. Media  $\pm$  EEM. Prueba t de Student,  $p < 0.05$ . \* Diferencia significativa con respecto al control.

- Efecto del estrés crónico leve impredecible sobre los niveles de colesterol y triglicéridos

Los niveles de colesterol no se vieron modificados en los diferentes tiempos de exposición a estrés crónico leve impredecible (Figura 6). Sin embargo, en los niveles de triglicéridos no se observaron cambios a los 20 y 60 días, sin embargo se observa una disminución del 51% a los 40 días de estrés [ $F(3,28)=4.24, p<0.006$ ].

- Efecto del estrés crónico leve impredecible sobre la oxidación de proteínas

La oxidación de proteínas fue utilizada como un marcador cualitativo del efecto del estrés sobre el estrés oxidante, en las Figuras 7 y 8 se representa la imagen obtenida del Oxiblot, posteriormente en la Tabla 2 se muestra de manera semicualitativa, el porcentaje de aumento o disminución en la oxidación de proteínas, considerando como 100% el valor obtenido en el grupo control, aunque se muestran diferencias en el porcentaje de aumento o disminución de la oxidación de proteínas, estos cambios son apreciables a partir del 50% de variación.

En relación con las estructuras cerebrales mostradas en la Figura 7, en hipotálamo no se aprecia un aumento a los 20 días y 40 días de exposición al estrés en comparación con el grupo control, aunque en la tabla se muestran diferencias estas no son apreciables en las imágenes del Oxiblot; sin embargo, en la corteza prefrontal e hipocampo se observó mayor oxidación en los grupos de estrés.

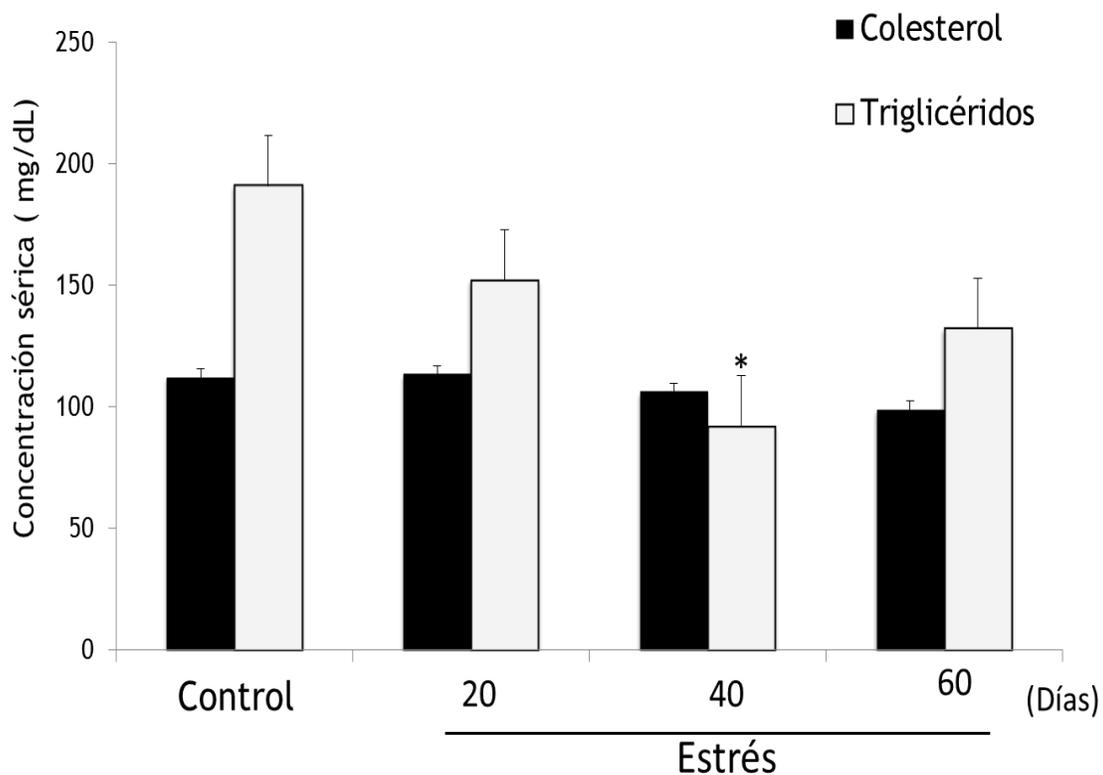


Figura 6.- Niveles séricos de triglicéridos y colesterol en ratas sometidas a diferentes tiempos de exposición a estrés crónico leve impredecible. Los niveles de colesterol no fueron modificados, mientras que los niveles de triglicéridos disminuyeron a los 40 días de estrés. ANOVA, Tukey  $p < 0.05$  ( $n=5$ ). \* Diferencia significativa con respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

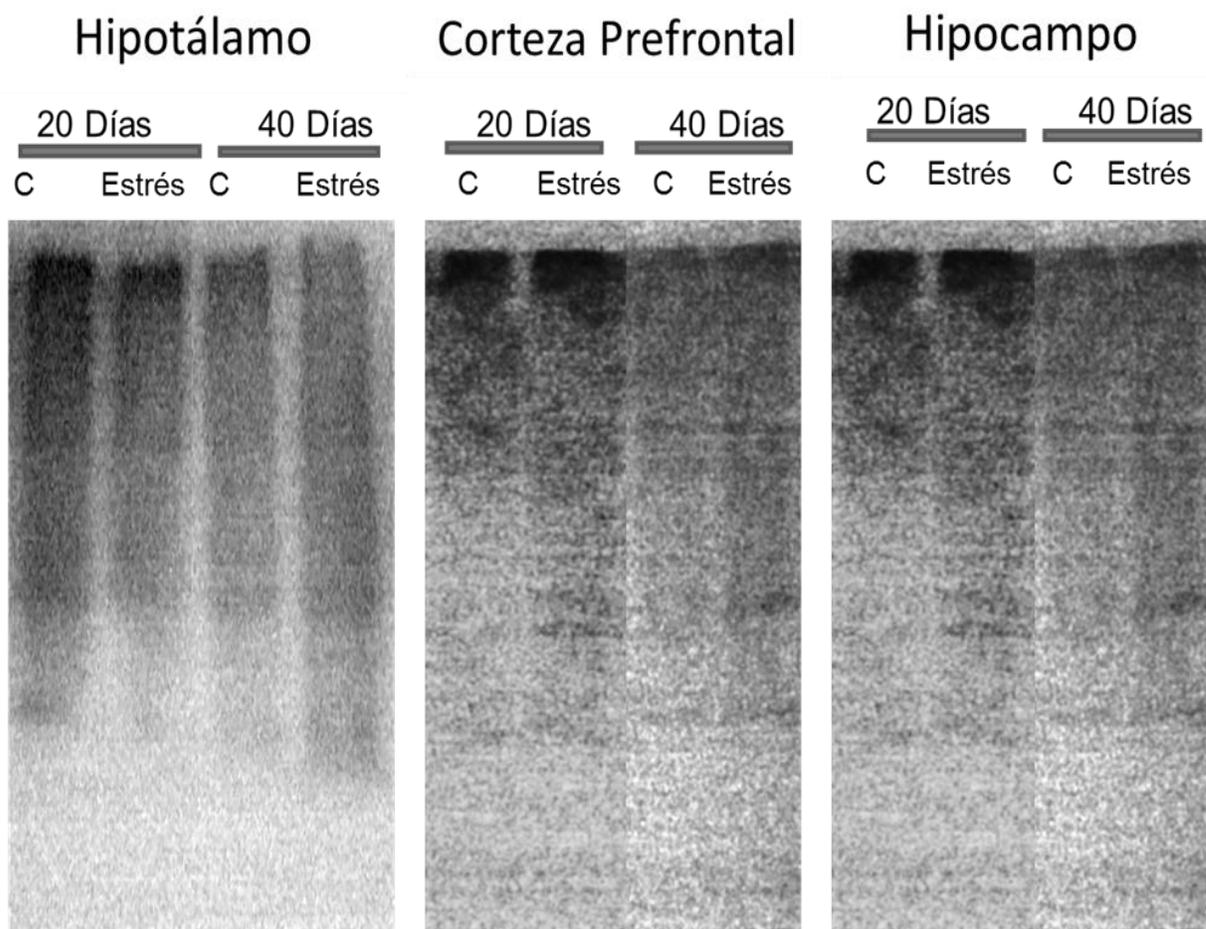


Figura 7. Oxidación de proteínas en hipotálamo, corteza cerebral e hipocampo de ratas sometidas a estrés crónico leve impredecible durante 20 y 40 días. C: Grupo control. Representación de 5 observaciones independientes.

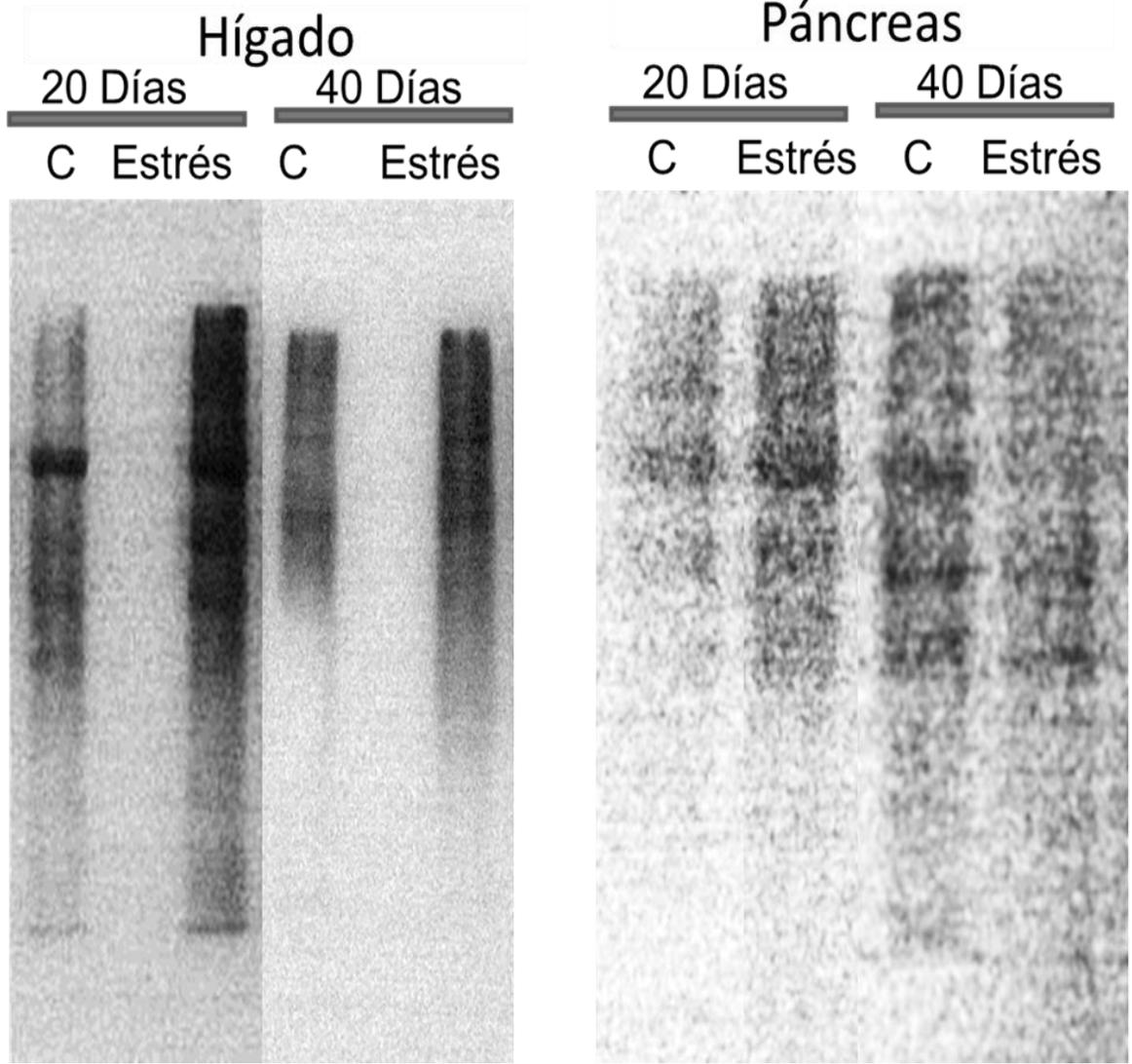


Figura 8.- Efecto del estrés crónico leve e impredecible sobre la oxidación de proteínas en hígado y páncreas. C: Control. Representación de 5 observaciones independientes.

Tabla 2.- Porcentaje de oxidación de proteínas en tejido cerebral y órganos de animales expuestos a 20 y 40 días de estrés crónico leve impredecible, se expresa el porcentaje de aumento (↑) o disminución (↓) con respecto al grupo control.

---

| <b><i>Estrés crónico leve impredecible</i></b> |                 |                  |
|--|-----------------|------------------|
|  | <b>20 días</b>  | <b>40 días</b>   |
| <b><i>Hipotálamo</i></b>                       | ↑ <b>14.4 %</b> | ↓ <b>37.91%</b>  |
| <b><i>Corteza Prefrontal</i></b>               | ↑ <b>76 %</b>   | ↓ <b>6.26 %</b>  |
| <b><i>Hipocampo</i></b>                        | ↑ <b>47.90%</b> | ↓ <b>21.45%</b>  |
| <b><i>Hígado</i></b>                           | ↑ <b>4.05%</b>  | ↑ <b>90.30%</b>  |
| <b><i>Páncreas</i></b>                         | ↑ <b>21.66%</b> | ↑ <b>11.17 %</b> |

---

Por otro lado, en hígado se observa mayor oxidación de proteínas a los 20 y 40 días de estrés, mostrando un incremento gradual del 90% a los 40 días de inducción de estrés. Mientras que en el páncreas solo se observa un aumento apreciable, del 21.66% a los 20 días de inducir el estrés (Figura 8).

- Efecto del estrés crónico leve impredecible en la actividad enzimática de SOD y CAT.

En las Figuras 9 y 10 se puede observar que la actividad de los mecanismos antioxidantes enzimáticos SOD y CAT. La SOD no se modifica con respecto al control en ninguna estructura cerebral, ni en ninguno de los órganos evaluados, sin embargo en páncreas se observa una diferencia significativa al tiempo de 40 días con respecto a los 20 días de exposición al estrés crónico leve impredecible [ $F(2,14) = 5.09, p < 0.02$ ].

Por el contrario la actividad de la CAT fue claramente disminuida en hígado a los 20 días de estrés [ $F(2,18) = 6.08, p < 0.003$ ], mientras que en hipotálamo se manifestó con un incremento significativo en relación con los valores obtenidos en el grupo control a los 20 días de estrés [ $F(2,11) = 6.08, p < 0.024$ ]. En el hipocampo, corteza prefrontal y páncreas no hubo modificaciones significativas.

## Actividad de SOD

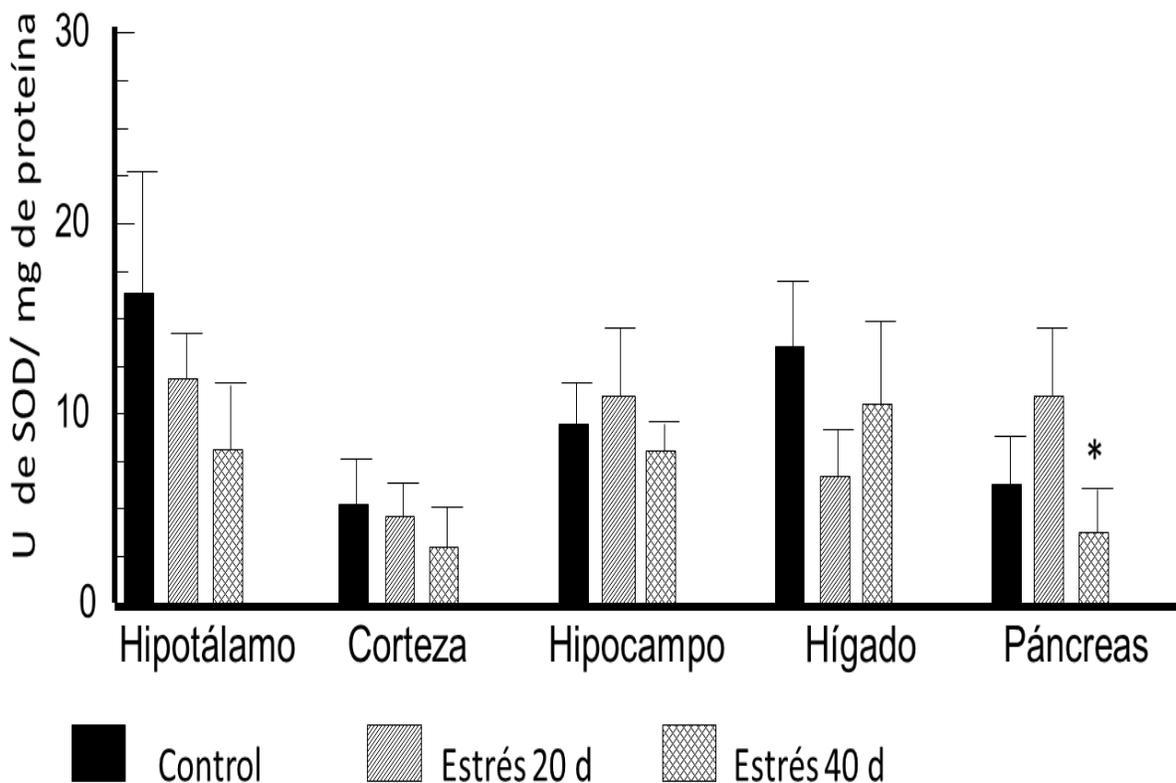


Figura 9.- Actividad de SOD en hipotálamo, corteza prefrontal, hipocampo, hígado y páncreas de animales sometidos a 20 y 40 días de estrés crónico leve impredecible. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM. ANOVA, Tukey  $p < 0.05$ . \* Diferencia significativa con respecto a los 20 días.

## Actividad de Catalasa

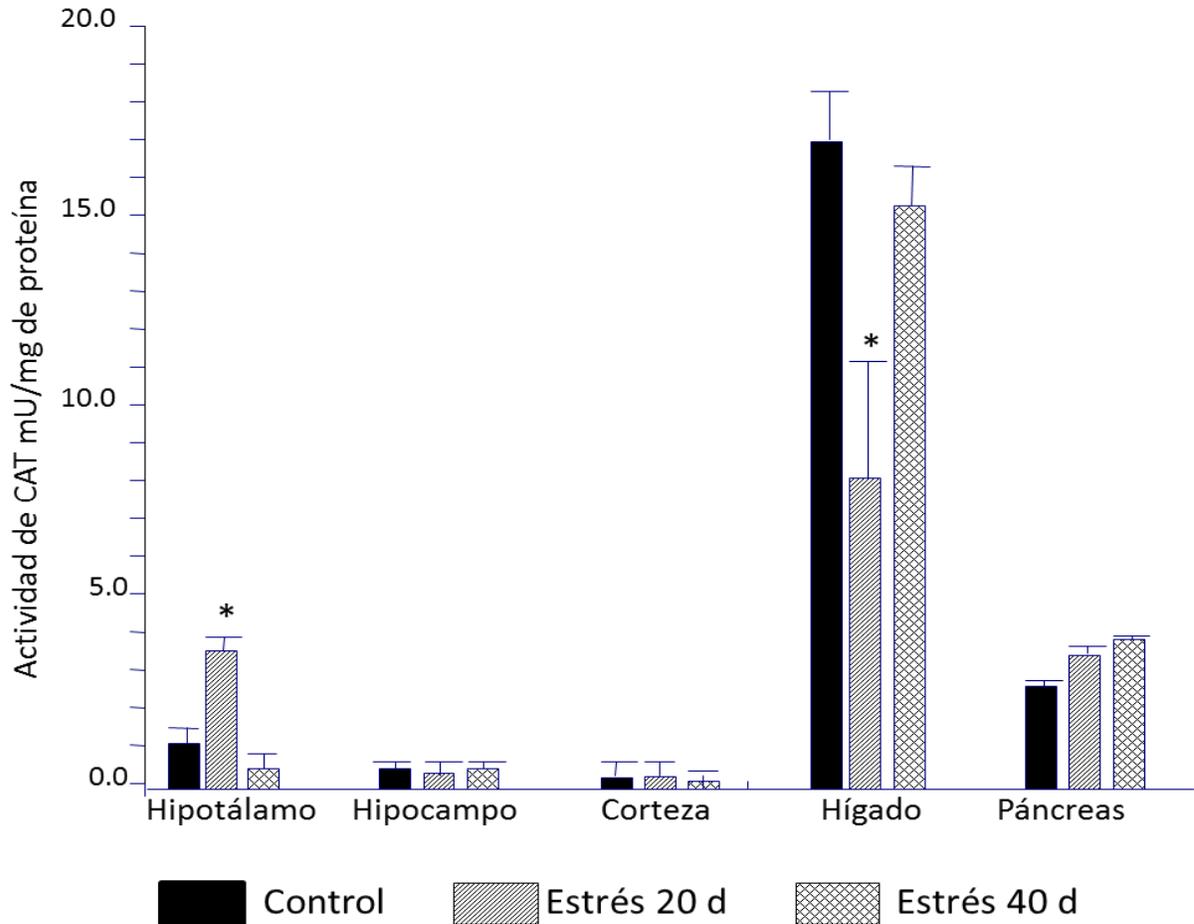


Figura 10.- Actividad de CAT en hipotálamo, corteza prefrontal, hipocampo, hígado y páncreas de animales sometidos a 20 y 40 días de estrés crónico leve e impredecible. ANOVA, Tukey  $p < 0.05$ . \* Diferencia significativa con respecto al control. Cada barra representa la media  $\pm$  EEM.

### **13.- Discusión**

En la respuesta al estrés se requiere de una interacción compleja que incluye la liberación e interacción de hormonas y neurotransmisores. La respuesta al estrés tiene inicialmente un efecto benéfico, encaminado a restablecer el desequilibrio causado por un estresor, sin embargo, la circulación crónica de los mediadores de la respuesta al estrés puede producir efectos nocivos, que van desde síntomas como dolor de cabeza, irritabilidad, gastritis, cansancio hasta el desarrollo de patologías neuronales o metabólicas (Selye, 1976; Chrousos, 2009).

La corticosterona es un marcador del efecto del estrés en el organismo, debido a que el incremento en los niveles de glucocorticoides asegura la activación del eje hipotálamo hipófisis adrenal (Johanson *et al.*, 1992; Salposki *et al.*, 2000; Chrousos, 2009). La secreción basal de glucocorticoides tiene un ritmo circadiano (Mazzocchi, 2011), en humanos el cortisol se encuentra elevado durante la mañana y progresivamente declina a lo largo del día, mientras que en roedores, que son de hábitos nocturnos, el mayor pico de secreción de corticosterona se presenta al inicio de la fase de oscuridad y el menor pico se manifiesta a las primeras horas de luz (Coponschi *et al.*, 1999; Retana *et al.*, 2003), por lo tanto de manera preferencial los estresores se aplicaron al inicio de la fase de luz, para probar que el aumento en las concentraciones séricas de corticosterona sean efecto del estrés crónico y no de la secreción basal de glucocorticoides. Los resultados revelan que el modelo de estrés crónico leve impredecible manifiesta un efecto sobre la activación del eje hipotálamo hipófisis adrenal, con la consiguiente liberación de corticotropina, dado que las

concentraciones de corticosterona fueron significativamente más altas en los grupos sometidos a estrés. Trabajos como el de Marín y colaboradores (2006), observan un incremento de corticosterona por efecto del estrés variable e inmovilización a 10 días, mientras que Gumuslu y colaboradores (2007) también observan el incremento de corticosterona en ratas sometidas a 21 días de inmovilización. Los resultados del presente trabajo son similares a los obtenidos por Lucca y colaboradores (2009), quienes muestran un incremento en los niveles de corticosterona en animales sometidos 40 días a estrés crónico leve impredecible, nuestros datos manifiestan activación del eje hipotálamo hipófisis adrenal a partir de los 20 días y hasta los 60 días de inducción de estrés. Por otro lado, Koolhaas y colaboradores (2011) enlistan los estresores que inducen aumento en los niveles de corticosterona, entre los que se encuentran la inmovilización, el frío, la inmersión en agua fría y los choques eléctricos, que también se han evaluado de manera crónica a 20 días (Retana *et al.*, 2003; Marin *et al.*, 2006; Gumuslu y Sahin, 2007). En estos trabajos el tiempo de tratamiento con el estresor no sobrepasa los 40 días debido a que es repetitivo y suele causar habituación en los animales. Así en el modelo de estrés crónico leve impredecible, al variar al estresor se evita la habituación de los animales, lo cual se deduce debido a que los niveles de corticosterona se mantuvieron altos aún después de los 40 días de exposición al estrés, por lo que el modelo de estrés crónico leve impredecible demuestra ser apropiado para evaluar estrés por periodos más prolongados de tiempo. Cabe señalar que durante los últimos 20 días de inducción de estrés se observaron cambios conductuales en los animales, como agresividad,

piloerección y resistencia a la manipulación, estas respuestas apoyan la idea de que el modelo de estrés crónico leve impredecible no causa habituación.

En el manejo de los carbohidratos en la prueba de tolerancia a la glucosa en ratas sometidas a diferentes tiempos de estrés, se observa una alteración de manera gradual. A los 20 días de estrés la tolerancia a la glucosa fue similar a la del grupo control. Sin embargo, a partir de los 40 días se observa intolerancia a la glucosa, que se agudiza a los 60 días de estrés, probablemente como una manifestación de resistencia a la insulina, que puede atribuirse a la estimulación constante de la función de los glucocorticoides (Saigí, 2010), además de que niveles altos de cortisol han sido asociados con la hiperglucemia de pacientes diabéticos (Clare y Thurby, 2008). Se ha visto en ratas que la administración de corticosterona por 14 días aumenta los niveles de glucosa (Hiroya *et al.*, 2010), también se ha visto que personas tratadas con glucocorticoides o diagnosticadas con Síndrome de Cushing manifiestan resistencia a la insulina (Melpomeni *et al.*, 2011). Por otro lado, se ha propuesto que la exposición crónica a glucocorticoides altera la señalización de la insulina, fosforilando al receptor de insulina e impidiendo la interacción con la misma, lo que provoca resistencia a la insulina (Tamashiro *et al.*, 2011).

Los resultados del peso corporal son consistentes con los efectos que se han observado en otros estudios, en donde la inducción de estrés crónico mediante estresores repetitivos como la inmovilización, el frío o la combinación de éstos, reduce la ganancia de peso (Marin *et al.*, 2006; Gumuslu y Sahin, 2007); esta reducción también se observó con la utilización de estrés crónico leve impredecible,

en donde la utilización de estresores variables altera la ganancia de peso corporal a partir de los 10 (Marín *et al.*, 2006), 20 (D'Aquila *et al.*,1994) y 40 días (Lucca *et al.*,2008, 2009; Tagliari *et al.*, 2010). Los presentes resultados muestran una reducción en la ganancia de peso hasta los 40 días, presentándose una pérdida de peso corporal a partir de los 45 días, siendo significativa de los 50 a los 60 días con respecto al control.

El modelo de estrés crónico leve impredecible, además de ser un modelo de estrés, es utilizado como un modelo animal de depresión inducida por estrés (D'Aquila *et al.*, 1994; Lucca *et al.*, 2008, 2009), en cuyo caso se evalúan algunas conductas complementarias que permiten determinar el estado depresivo como la anhedonia (incapacidad para experimentar placer); entre estas evaluaciones se encuentra el registro del consumo de alimento dulce, como parte de una conducta reconfortante y placentera. Además se maneja la pérdida de peso como una consecuencia de la inhibición de conductas reconfortantes, por la anhedonia. Por otro lado, al considerar las acciones permisivas de los glucocorticoides propuestas por Salposky y colaboradores (2000), al amplificar y prolongar la respuesta al estrés se requiere mayor requerimiento energético y esto puede justificar la pérdida de peso corporal.

Las alteraciones en la ganancia de peso corporal se relacionan con los valores de triglicéridos, que se observan disminuidos significativamente a los 40 días de tratamiento. La variación en los ácidos grasos libres o triglicéridos, manifiesta que si hay bajos niveles de triglicéridos circulantes es debido a que son empleados como reserva en diferentes tejidos sobre todo si aumenta la demanda energética debida a

una condición de estrés. En condiciones de estrés se libera principalmente cortisol y adrenalina, que ejercen un efecto inhibitorio sobre la síntesis y liberación de insulina (Dallman, 1993), induciendo déficit de glucosa en la célula y reducción de las reservas energéticas. Los glucocorticoides producidos ejercen su acción afectando la regulación y expresión de genes que participan en el control del metabolismo y en el manejo de las reservas energéticas (Chrousos, 2009). Por su parte, el aumento de la adrenalina circulante favorece la rápida movilización de recursos metabólicos y la orquestación de la respuesta de enfrentamiento al estrés, de lucha o huida (Munch, 1995). Cuando los glucocorticoides se encuentran elevados de manera crónica, potencian el efecto del glucagón y adrenalina, lo que favorece la activación de la glucogenólisis y gluconeogénesis, además de favorecer la movilización de lípidos y la inhibición de la síntesis de proteínas (Munch, 1995; Santana, 1995). Además de la alta demanda energética, los bajos niveles de triglicéridos se debe a que la célula no almacena ácidos grasos provenientes del metabolismo de carbohidratos, debido a que no puede introducir glucosa al interior de las células, por lo que el recurso energético empieza a obtenerse de vías metabólicas como la glucogénolisis o vías alternas al catabolismo de glucosa como la beta oxidación y gluconeogénesis. De esta manera se podría explicar la pérdida del peso corporal que se presenta justamente después de los 40 días de tratamiento, cuando se observa alterado el metabolismo de carbohidratos, además de manifestarse intolerancia a la glucosa, la cual podría ser consecuencia de resistencia a la insulina.

La disminución en los niveles de triglicéridos observada en nuestros resultados parece contraria a los efectos causados por los glucocorticoides, los cuales favorecen la movilización de lípidos, por lo que es común encontrar hiperlipidemia y un reacomodo de la grasa corporal, como ocurre en el síndrome de Cushing (Melpameni, *et al.*, 2011). En este sentido, Tamashiro y colaboradores (2011) proponen que los efectos del estrés sobre el control metabólico son un factor de riesgo importante para el desarrollo de sobrepeso y obesidad. Pese que no existe evidencia de que el estrés cause diabetes o síndrome metabólico o alguna otra patología, la elevación de glucosa desde los sitios de almacenaje a la circulación, es considerado como un factor de riesgo de enfermedades neurodegenerativas y metabólico crónicas (Mitra, 2008), además de que el antagonismo en la secreción de insulina favorece el estado hiperglucémico (Bjorntop; 1997). Sin embargo, cabe mencionar que la respuesta al estrés, y por lo tanto a los glucocorticoides, depende en gran medida de la naturaleza del estresor, del tiempo de exposición, intensidad, la duración y la frecuencia, así como del estado de salud en el que se encuentre el individuo.

Además de las alteraciones metabólicas producida por los glucocorticoides y la adrenalina, también ejercen su efecto sobre la función antioxidante y la producción de especies reactivas, debido a que modelos de estrés repetitivo han sido asociados al aumento en la producción de radicales libres y a la disminución de la actividad de enzimas antioxidante (Liu *et al.*, 1994; Gumuslu y Sahin, 2002, 2007).

En esta investigación, para evaluar el estrés oxidante en el modelo de estrés crónico leve impredecible se determinó la oxidación de proteínas por un método cualitativo en las diferentes estructuras cerebrales (hipotálamo, corteza prefrontal e hipocampo), así como en hígado y páncreas. Se encontró mayor oxidación de proteínas en corteza prefrontal e hipocampo en ambos grupos de estrés, lo que sugiere mayor producción de especies reactivas de oxígeno y, por lo tanto, presencia de estrés oxidante. Por otro lado, se observa mayor oxidación de proteínas en hígado a 20 y 40 días, mientras que en páncreas, se observa mayor oxidación de proteínas a 20 días; el aumento en la oxidación de proteínas tanto en hígado como en páncreas, a 20 días, puede ser ocasionada como parte de los mecanismos de resistencia al estrés, en los cuales se pretende contrarrestar el efecto causado por el estresor; sin embargo, a los 40 días se observa mayor oxidación de proteínas en hígado que puede ser asociada a la carga metabólica que se presenta a los 40 días, en donde empieza a manifestarse intolerancia a la glucosa y disminución de triglicéridos. En páncreas no se aprecia diferencia a 40 días, sin embargo existe una relación estrecha entre las funciones del páncreas y el hígado en la regulación del metabolismo, por lo que se sugiere estudiar a detalle esta asociación.

En relación con la determinación de la actividad de antioxidantes enzimáticos, se realizó la evaluación de las enzimas SOD y CAT, cuya actividad consiste en detener la formación de radicales libres. Se ha visto que el cerebro es un órgano muy susceptible al daño por estrés, debido a que tiene capacidad antioxidante limitada (Fontella *et al.*, 2005). La presencia de daño puede explicarse por elevados niveles

de glucocorticoides (Hiroya *et al.*, 2010) o de glucosa (Tamashiro *et al.*, 2011). En ambos casos se propone que desórdenes neurológicos como la depresión y el estrés por trauma se deben a la pérdida de neuroplasticidad, entendiendo a ésta como la capacidad del cerebro de responder y adaptarse al medio. La actividad de SOD y CAT se ha reportado incrementada en cerebro por efecto del estrés por inmovilización a 20 días (Gumuslu y Sahin, 2007); a 40 días de estrés por inmovilización (Fontella *et al.*, 2005); también se ha encontrado SOD disminuida y CAT aumentada en estructuras cerebrales bajo condiciones de estrés a 40 días en corteza prefrontal, hipocampo, cerebelo y estriado (Lucca *et al.*, 2009).

El hipocampo es una estructura primordial en la integración y terminación de la respuesta al estrés (Conrad, 2008), en el hipocampo se llevan a cabo procesos celulares como la neurogénesis (Timothy *et al.*, 2011), diferenciación celular, la expresión de receptores a glucocorticoides (Hiroya *et al.*, 2010), necesarios para el manejo de la respuesta al estrés, además de procesos cognitivos, como el aprendizaje y la consolidación de la memoria. Además el hipocampo se ha estudiado debido a su participación en procesos cognitivos, en los que la falta de concentración y consolidación de la memoria se asocia con una la pérdida neural causada por corticosterona (Hiroya *et al.*, 2010). Otros autores reportan disminución en la actividad de SOD y una incremento en la actividad de la CAT en ratas sometidas a estrés crónico impredecible, atribuyéndole esto a la activación del eje HHA la que podría inducir el efecto, disminuyendo su actividad o influyendo en su producción

(Husum y Mathe, 2002). En nuestros resultados en SOD se aprecia una tendencia a disminuir actividad a partir de 20 días.

Considerando que el modelo de estrés crónico leve induce un aumento en el daño oxidativo y alteraciones en la actividad de SOD, es probable que a largo plazo se puedan generar enfermedades ligadas al estrés, tales como la depresión y otros trastornos asociados incluso con el síndrome metabólico y la resistencia a la insulina.

En nuestros resultados de SOD no se observaron diferencias significativas con respecto al control, sin embargo se observó una tendencia a disminuir la actividad de esta enzima en hipocampo y corteza cerebral, comparable con los resultados publicados por Lucca y colaboradores (2009). Además en páncreas se observa una disminución en la actividad de CAT con respecto a los 20 días de inducción del estrés, lo que puede ser considerada como una alteración en la actividad de esta enzima a consecuencia del estrés. En cuanto a la actividad de la CAT, se observó un aumento significativo en hipocampo a los 20 días, que lo podemos atribuir al proceso de integración en el que participa el hipocampo, un efecto muy similar a lo reportado por Hushum y Mate (2002).

En nuestros resultados se observaron algunos cambios de actividad enzimática en hígado y páncreas, sin embargo la actividad de SOD tendió a disminuir en hígado a los 20 días y a aumentar a los 40 días. Mientras que la actividad de la CAT en hígado disminuyó significativamente a los 20 días y la trata de restablecer hacia los 40 días de estrés crónico leve. Al respecto se tiene reportado que la actividad de SOD y CAT

aumenta bajo condiciones de estrés por inmovilización a 20 días (Gusmuslu y Sahin, 2007). La corteza prefrontal también ha sido reportada en inmovilización a 20 días, aunque no tan exhaustivamente como el hipocampo, pero en nuestro estudio no manifestó cambios en la actividad enzimática (Lucca *et al.*, 2009) por otro lado en hipotálamo hay pocos estudios, los resultados obtenidos no muestran diferencias en CAT de corteza e hipotálamo

En el caso del páncreas no se han reportado alteraciones en las actividades enzimáticas debidas a estrés. Se encontraron diferencias apreciables en el páncreas, con una reducción de la actividad enzimática SOD, lo que manifiesta que el estrés está modificando la actividad de antioxidantes. Aunque no se encontraron diferencias significativas en nuestro estudio de CAT con páncreas, se observa una tendencia contraria al hígado en la actividad enzimática de SOD, manifestando un aumento en la actividad a los 20 días y disminuida a los 40 días, sin presentar cambios en la actividad de CAT.

La elevada concentración de glucocorticoides, a consecuencia del estrés crónico acumulativo, puede influenciar la vulnerabilidad de las diferentes regiones del cerebro, particularmente el hipocampo.

Considerando la definición de homeostasis, propuesta por Cannon (1932), el proceso adaptativo involucra una complicada regulación en la producción hormonal, neuroquímica y de moléculas oxidantes, como las especies reactivas de oxígeno; el desequilibrio y la sobreinteracción de estos sistemas favorece la generación de

moléculas oxidantes, como los radicales libres, lo que podría favorecer daños oxidativos a proteínas y estructuras celulares.

Otro aspecto de gran importancia es que el estrés oxidante puede proceder de dos condiciones: Por deficiencias en los mecanismos antioxidantes o de aumento en la producción de especies reactivas que supere la capacidad de los mecanismos antioxidantes, como en el caso de la sobreactivación de vías metabólicas para mantener una situación de estrés. Además la relación con el estrés oxidante es de gran relevancia debido a que la producción de especies reactivas de oxígeno juega un papel dual en las funciones fisiológicas del organismo: por un lado participan en las cascadas de transducción de señales, favoreciendo la activación de factores de transcripción responsables de la regulación en la expresión de genes relevantes para el crecimiento y la diferenciación celular; por otro lado, causan daño oxidativo en el DNA, lípidos y proteínas, lo que puede resultar en la iniciación y desarrollo de numerosas enfermedades, como el cáncer, enfermedad cardiovascular, diabetes mellitus tipo 2, cataratas, artritis reumatoide o enfermedades neurodegenerativas (Wojcik, 2010). Al respecto se han formulado varias hipótesis sobre los mecanismos de daño que participan en la respuesta al estrés, incluso se ha propuesto la atrofia de las glándulas suprarrenales, en la que la atrofia adrenal puede proceder de un periodo de estrés crónico (Lucca et al, 2008).

La participación de los GCs en la generación de especies reactivas ha sido más estudiada sin embargo también se tiene evidencia de que en el sistema nervioso central la auto oxidación de catecolaminas produce quinonas, que son productos de

la oxidación de los grupos alcoholes (-OH) que presentan los fenoles (Santiago y Rivas, 2008), un aspecto importante que caracteriza a las quinonas es su deficiencia de electrones, estas especies sufren transferencia de electrones de manera simultánea, por lo que constantemente se oxidan o se protonan (Graham 1978), por lo que se les considera generadoras de radicales libres. La ruptura metabólica de la dopamina, serotonina y noradrenalina, que es catalizada por la monoaminoxidasa, también produce peróxidos y anión superóxido (Barja y Herrero, 2000).

Por otro lado los mediadores del eje HHA ejercen efectos secundarios que podrían estar implicados en las alteraciones metabólicas. Por ejemplo, la hiperfunción de neuronas receptoras de CRH parece estar involucrada en una variedad de trastornos psiquiátricos, gastrointestinales, enfermedades cardiovasculares, metabólicas y reproductivas atribuibles al estrés. Ante esta hipótesis se ha propuesto que péptidos antagonistas a los receptores CRH tipo-1 son nuevas herramientas para moderar la actividad de CRH en el cerebro, que se produce al sobreactivar el eje HHA, lo que podría ser un blanco terapéutico contra las enfermedades atribuidas al estrés (Gagnoli, 2011).

## **14.- Conclusiones**

Con base en los resultados obtenidos se propone el modelo de estrés crónico leve impredecible para estudiar los aspectos metabólicos y bioquímicos por periodos más largos de tiempo, debido a que los resultados obtenidos sugieren que este modelo no causa habituación aún a 60 días de estrés, por lo que se presenta como un modelo que permite el estudio del estrés crónico.

El estrés crónico inducido por el modelo de estrés crónico leve impredecible manifiesta sus efectos metabólicos en el manejo de carbohidratos y lípidos, a partir de los 40 días, en los cuales se observa intolerancia a la glucosa, disminución en los niveles de triglicéridos y de la ganancia del peso corporal después de 40 días de estrés.

El modelo de estrés crónico leve impredecible produce mayor oxidación de proteínas en los grupos de estrés que en el grupo control que no fue sometido a estrés, además, el modelo de estrés modifica la actividad enzimática antioxidante en hipotálamo e hígado a 20 días y en páncreas a 40 días, lo cual sugiere que el estrés oxidante podría estar involucrado en las alteraciones metabólicas inducidas por estrés crónico leve impredecible en ratas. Este trabajo aporta evidencia y nuevos datos sobre la participación del estrés oxidante en los mecanismos de daño asociados a estrés fisiológico.

## **15.- Bibliografía**

Mitra Analava. (2008). Diabetes and Stress: A Review. *Ethno-Med.* 2; 131-135.

Andrews M.H., Wood S.A., Windle R.J., Lightman S.L., Ingram C.D. (2011). Acute Glucocorticoid Administration Rapidly Suppresses Basal and Stress-Induced Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis Activity. *Endocrinology*. PMID: 22087024.

Babior B., Kipnes R., Curnutte J. (1973). Biological defense mechanisms. The production by leukocytes of superoxide, a potential bactericidal agent. *The Journal of Clinical Investigation.* 52; 741-750.

Babior B.M. (2002). The leukocyte NADPH oxidase. *Israel Medical Association Journal.* 4; 1023-1024.

Bachis Alessia, Maria Idalia Cruz, Rachael L. Nosheny y Italo Mocchetti. (2008). Chronic Unpredictable Stress Promotes Neuronal Apoptosis in the Cerebral Cortex. *Neuroscience Letters.* 442; 104–108.

Barja C., Herrero A. (2000). Oxidative damage to mitochondrial DNA is inversely related to maximum life span in the heart and brain of mammals. *FASEB.* 14; 312-318.

Beers R.F., Sizer L.W. (1952). A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *The Journal of Biological Chemistry.* 195; 133-140.

Bjorntop P. (1997). Body fat distribution, insulin resistance and metabolic diseases. *Nutrition.* 13;795–803.

Bonilla-Jaime H., Vázquez-Palacios G., Velázquez-Moctezuma J. (2000). Los trastornos psiquiátricos y sus modelos animales. En *Tópicos de Psiquiatría Biológica*. Velázquez Moctezuma J. Sociedad Mexicana de Psiquiatría Biológica. Universidad Autónoma Metropolitana. México. 298-320.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry.* 72; 248-254.

Brown R.E. (1994). *Introduction to Endocrinology*. Cambridge University Print. 30-52; 88-107.

McEwen Bruce S., John C. Wingfield (2010). What's in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Hormones and Behavior*, 57; 105.

Cannon W.B. (1932). *The Wisdom of the Body*. W.W. Norton & Company, Inc., New York.

Cheesman K., Slater T. (1998). Free radicals in medicine. *Br Med Bull journals*. 4; 841-893.

Chrousos George P. (1995). The hypothalamic pituitary adrenal axis and immune mediated inflammation. *Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital*, 332; 1352-1362.

Chrousos, George P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology*. 5; 374–381.

Clore JN, Thurby H. L. (2009). Glucocorticoid-induced hyperglycemia. *Endocrine Practice*.15; 469-474.

Conrad C.D. (2008). Chronic stress-induced hippocampal vulnerability: the glucocorticoid vulnerability hypothesis. *Review of Neuroscience*, 19; 395-411.

Copinschi G, Van Reeth O, Van Cauter E (1999). Biologic rhythms. Nyctemeral variation in man. *Presse Medical*. 28; 936-941.

Cosío B.G., Torrego A., Adcock I.M. (2005). Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Arch Bronconeumol*. 4; 34-41.

Currie Gemma., Freel Marie, Perry Colin G. Dominiczak Anna F. (2011). Disorders of blood pressure regulation- role of catecholamine biosynthesis, Release, and metabolism. *Current Hypertension Reports*. PMID: 22068338.

Dallman M, Strack A, Akana S, Bradbury M, Hanson E, Scribner K, Smith M (1993) Feast and famine: critical role of glucocorticoids with insulin in daily energy flow. *Front Neuroendocrinol* 14; 303–347.

Dallman, M.F. (2007). Modulation of stress responses: how we cope with excess glucocorticoids. *Experimental Neurobiology*. 206, 179–182.

D'Aquila P.S., Brain P., Willner P. (1994). Effects of chronic mild stress on performance in behavioural tests relevant to anxiety and depression. *Physiology and Behavior*. 56; 861-867.

De Kloet, E.R., Joels M., Holsboer F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience*. 6; 463–475.

De Kloet, E.R., Karst, H., Joels, M. (2008). Corticosteroid hormones in the central stress response: quick-and-slow. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 29; 268–272.

Fridovich I. (1978). The biology of oxygen radicals. *Science*. 201; 875–880.

Goldstein D.S., McEwen B. (2002). Allostasis, homeostats and the nature of stress. *Stress*. 5; 55-58.

González G.F. (1999). Neuroendocrinología. *Revista Peruana de Endocrinología y Metabolismo*. 4; 57-82.

Gragoli C. (2011). Depression and type 2 diabetes: Cortisol pathway implication and investigational needs. *Journal of Cellular Physiology*. PMID: 21898408.

Graham D.G. (1978). Oxidative pathways for catecholamines in the genesis of neuromelanin and cytotoxic quinones. *Molecular Pharmacology*. 14; 633-643.

Graham D.G. (1984). Catecholamines toxicity: A proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and Parkinson's disease. *Neurotoxicology*. 5; 83-96.

Grippe A.J., Beltz T.G., Johnson A.K., (2003). Behavioral and cardiovascular changes in the chronic mild stress model of depression. *Physiology and Behavior*. 78; 703-710.

Gümüşlü S., Sahin E. (2007). Immobilization stress in rat tissues: alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 144; 342-347.

Gumuslu, S.B. Sarikcioglu, E. Sahin, P. Yargicoglu, A. Agar. (2002). Influences of different stress models on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat erythrocytes. *Free Radical. Research*. 36; 1277–1282.

Gunnar Megan, Quevedo Karina. (2007). The neurobiology of stress and development. *Annual Reviews and Psychology*. 58; 145-173.

Gutiérrez Venereo Justo R. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Revista Cubana de Medicina del Instituto Superior de Medicina Militar*. 31; 126-133.

Hadju J., Wyss S., Aebi H. (1977). Properties of human erythrocyte catalases after crosslinking with bifunctional reagents: symmetry of the quaternary structure. *European Journal of Biochemistry* . 80; 199-207.

Hiroya Sato, Takeyuki Takahashi, Kazumi Sumitani, Hirokatsu Takatsu, Shiro Urano. (2010). Glucocorticoid generates ROS to induce oxidative injury in the hippocampus, leading to impairment of cognitive function of rats. *Journals Clinical of Biochemistry*. 47; 224-232.

Husum, H., Mathe, A.A. (2002). Early life stress changes concentrations of neuropeptide Y and corticotropin-releasing hormone in adult rat brain: lithium treatment modifies these changes. *Neuropsychopharmacology*. 27; 756–764.

Johansen J.S., Harris A.K., Rychly D.J., Ergul A. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology* 4:5.

Johnson E.O., Kamilaris-Themis C.C., Chrousos G.P., Gold P.W. (1990). Mechanisms of stress: A dynamic Overview of hormonal and behavioral homeostasis. *Neuroscience and Bio behavioral*. 16; 115-130.

Kamper E.F., Chatzigeorgiou A., Tsimpoukidi O., Kamper M., Dalla C., Pitychoutis P.M., Papadopoulou Daifoti Z. (2009). Sex differences in oxidant/antioxidant balance under a chronic mild stress regime. *Physiology and Behavior*. 4; 215-222.

Konigsberg F. M. (2007). Radicales libres y estrés oxidativo. *Aplicaciones médicas*, 1a ed., México: El Manual Moderno México.

Koolhaas J.M., Bartolomucci A., Buwalda B., de Boer S.F., Flügge G., Korte S.M., Meerlo P., Murison R., Olivier B., Palanza P., Richter-Levin G., Sgoifo A., Steimer T., Stiedl O., van Dijk G., Wöhr M., Fuchs E. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Behaviors Reviews*. 35; 1291-1301.

Korte S.M., Koolhaas J.M., Wingfield J.C., McEwen, B.S. (2005). The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neuroscience and Biology behavioral*. 29; 3–38.

Kyrou I., Tsigos C. (2009). Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology*. 9; 787-793.

Levine, S., Ursin, H. (1991). What is stress? In: Brown, M.R., Koob, G.F., Rivier, C. (Eds.) *Stress: Neurobiology and Neuroendocrinology*. Marcel Dekker, Inc., New York. 3–21.

Liu X. Wang, A. Mori (1994). Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione. *International Journal of Biochemistry.*, 26; 511–517

Lloyd Cathy, Ph. D; Julie Smith, BSc, R.G.N., MSc ,Katie Weinger, Ed.D. R.N. (2005). *Stress and Diabetes: A Review of the Links*. *Diabetes Spectrum*. 18; 121-127.

Lodish Harvey, Arnols Berh. (2005). *Biología celular y molecular*. Quinta edición. Editorial panamericana. 1088.

Lucca Giancarlo, Clarissa M. Comim, Samira S. Valvassori, Josimar G. Pereira, Laura Stertz, Elaine C. Gavioli, Flavio Kapczinsk, João Quevedo (2008). Chronic Mild Stress Paradigm Reduces Sweet Food Intake in Rats without Affecting Brain Derived Neurotrophic Factor Protein Levels .*Current Neurovascular Research*. 5; 207-213.

Lucca Giancarlo, Comim C. M., Valvassori S. S., Réus G. Z., Vuolo F., Petronilho F., Dal-Pizzol F., Gavioli E. C., Quevedo J. (2009). Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain. *Neurochemistry International*. 54; 358-362.

Marian Joe“ls , Henk Karst, Harmen J. Krugers, Paul J. Lucassen Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 28; 72–96

Marin M.T., Cruz F.C., Planeta C.S. (2006). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology and Behavior*. 30; 29-35.

Marklund, S. (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 79; 7634–7638.

Mazzoccoli G, Carughi S, Sperandeo M, Paziienza V, Giuliani F, Tarquini R. (2011). Neuro-endocrine correlations of hypothalamic-pituitary-thyroid axis in healthy humans. *J Biol Regul Homeost Agents*. 25;249-57.

McCord J. (1974). Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*. 85; 529-531.

McCord J., Fridovich I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemoglobin (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*. 244; 6049-6055.

McCord J., Turrens J. (1994) Ischemia and Reperfusion. In "Current Topics in Bioenergetics: Molecular aspects of Mitochondrial Pathology" (Lee, C.P. ed). Academic Press, Orlando. 17; 173-195.

McEwen B.S. (2002). Sex, stress and the hippocampus: allostasis, allostatic load and the aging process. *Neurobiology of Aging*. 23; 921-939.

McEwen Bruce (1998). Stress adaptation, and disease: allostasis and Allostatic load. *Neuroimmunomodulation: molecular aspects, integrative systems and clinical advances*. 840; 11-44.

McEwen, B.S., Wingfield, J.C. (2010). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*. 43; 2–15.

Melpomeni Peppas, Maria Krania, Sotirios A. Raptis. (2011). Hypertension and other morbidities with Cushing's syndrome associated with corticosteroids: a review. *Integrated Blood Pressure Control*. PMID: 21949634.

Mooy J.M., De Vries H., Grootenhuys P.A., Bouter L.M., Heine R.J. (2000). Major stressful life events in relation to prevalence of undetected type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 23; 197–201.

Morilak David A., Gabe Barrera, Echeverria April S., Hernández Shuaike. (2005). Role of brain in the behavioral response to stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 29; 1214 – 1224.

Munck A, Na'ray-Fejes-To' th A (1995) Glucocorticoid action. *Physiology In: DeGroot LJ (ed) Endocrinology*. W.B. Saunders Co., Philadelphia, 1642–1656.

Peters S., Grunwald N., Rümmele P., Endlicher E., Lechner A., Neumann I.D., Obermeier F., Reber S.O. (2011). Chronic psychosocial stress increases the risk for inflammation-related colon carcinogenesis in male mice *Stress*. PMID: 22044139.

Preston G.A., Lyon T.T., Yin Y., Lang J.E., Solomon G., Annab L., Srinivasan D.G., Alcorta D.A., Barrett J.C. (1996). Induction of apoptosis by c-Fos protein, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 16; 211-218.

Reagan L.P. (2002). Glucose, stress and hippocampal neuronal vulnerability. *International Review of Neurobiology*. 52; 289-324.

Reagan Lawrence P., Claudia A. Grillo, Gerardo G. Piroli. (2008). The As and Ds of stress: Metabolic, morphological and behavioral consequences. *European Journal of Pharmacology*. 585; 64-75.

Retana Márquez S., Bonilla Jaime H., Vázquez Palacios G., Domínguez Salazar E., Martínez-García R., Velázquez-Moctezuma J. (2003). Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psych neuroendocrinology*. 2; 207-227.

Saigí I., Pérez A. (2010). Management of glucocorticoid induced hyperglycemia. *Revista Clinica Española*. 210; 397-403.

Salposky Robert M., L. Michael Romero, Allan U. Munck. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews*. 21; 55-89.

Sandín B. (2003). El estrés: Un análisis basado en el papel de los factores sociales. *International Journal of Clinical and Health Psychology*. 3; 141-157.

Santana P., Akana S.F., Hanson E.S., Strack A.M., Sebastian R.J., Dallman MF (1995) Aldosterone and dexamethasone both stimulate energy acquisition whereas only the glucocorticoid alters energy storage. *Endocrinology*. 136; 2214–2222.

Santiago López D., Rivas Arancibia S. (2008). Estrés oxidativo, metabolitos oxidados de dopamina y enfermedad de Parkinson. *Revista de la Facultad de Medicina, UNAM*. 51; 104-107.

Selye H. (1936). Thymus and adrenals in response of the organism to injuries and intoxications. *British Journal of Experimental Pathology* 17:234–241.

Selye H. (1976). *The Stress of Life*. New York: McGraw Hill.

Selye, H., Ph. D., F.R.S. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*. 17; 1382-1392.

Sen, C. K., Packer, L. (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB Journal*. 10; 709-720.

Singh A., Petrides J.S., Gold P.W., Chrousos G.P. (1999). Differential of Clinical *Endocrinology and Metabolism*. 84; 1944-1949.

Souza E.B., Grigoriadis D.E. (1991). Role of Brain, Pituitary and Spleen Corticotropin-Releasing Factor Receptors in the Stress Response. *Methods Achieve in Experimental Pathology*. 14; 23-44.

Stanford S.C., Salmon P. (1993). *Stress: from synapse to syndrome*. Academic Press London. 282-321.

Stratakis, C. A., Chrousos, G. P. (1995). Neuroendocrinology and pathophysiology of the Stress System. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 771; 1–18.

Sumimoto H., Miyano K., Takeya R. (2005). Molecular composition and regulation of the Nox family NAD(P)H oxidases. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 9; 677-686.

Tagliari B., Tagliari A.P., Schmitz F., da Cunha A.A., Dalmaz C., Wyse A.T. (2011). Chronic variable stress alters inflammatory and cholinergic parameters in hippocampus of rats. *Neurochemical Research*. 36; 487-493.

Tamashiro K.L., Sakai R.R., Shively C.A., Karatsoreos I.N., Reagan I.P. (2011). Chronic stress, metabolism, and metabolic syndrome. *Stress*. 14: 468-479.

Timothy J. Schoenfeld, Elizabeth Gould. (2007). Stress, stress hormones, and adult neurogenesis . doi:10.1016/j.expneurol.2011.01.008

Toren F., Nikki Holbrook J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Journal Nature*. 208; 239-247.

Tsigos C., Chrousos G.P. (2002). Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research*. 53; 865-871.

Tzu C., Kwam L., Hish C. (2003). Age dependent increase of mitochondrial DNA deletions together with lipid peroxide and superoxide dismutase in human liver mitochondria. *Free Radicals and Biology Medical*. 16; 207-214.

Venkataraman S., Munoz R., Candido C., Witchel S.F. (2007). The hypothalamic pituitary adrenal axis in critical illness. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*. 8; 365-373.

Warner-Schmidt J.I., Duman Rs. (2006). Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus*, 16; 239-49.

Willner P. (1997). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*. 134; 319-329.

Willner P., Muscat R. (1992). Suppression of sucrose drinking by chronic mild unpredictable stress: a methodological analysis. *Neuroscience and Behavior*. 16; 507-517.

Winterbourn C. Ch., Hawkins E.R., Brian M., Carrell R.W. (1975). The estimation of cell peroxidase dismutase activity. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 85; 337-3342.

Wojcik M., Burzynska-Pedziwiatr I., Wozniak L.A. (2010). A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Current Medicinal Chemistry*. 17; 3262-3288.

Ya J., Diamond A. (2003). Role of Glutathione Peroxidase 1 in Breast Cancer: Loss of Heterozygosity and Allelic Differences in the Response to Selenium. *Cancer Research*. 63; 3347-3351.

Zafir A., Banu N. (2009). Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. 46; 53-58.

Zangar R., Davydov D., Verma S. (2004). Mechanims that regulate production of reactive oxigen species. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 199; 316- 331.

Zavaskis Ely J.J., Wilson S.L. (2011). Diabetes and stress: an anthropological review for study of modernizing populations in the US-Mexico border region. *Rural and Remote Health*. 11; 1758.