



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

EL ESTRÉS CRÓNICO LEVE IMPREDECIBLE ALTERA EL SISTEMA DE  
REGULACIÓN NEUROENDOCRINA DEL APETITO-SACIEDAD, Y PRODUCE  
ESTRÉS OXIDANTE E INFLAMACIÓN SISTÉMICA EN RATA.

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN BIOLOGÍA  
EXPERIMENTAL PRESENTA:

**M. en B. E. ANA LAURA LÓPEZ LÓPEZ**

**CO-DIRECTORES**

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME.

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCÓN AGUILAR.

**ASESORA**

DRA. MARÍA DEL CARMEN ESCOBAR VILLANUEVA

JULIO 2016

---

## 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 Javier 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.

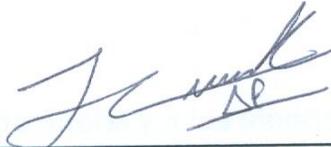
Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa

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 y la doctora María del Carmen Escobar Villanueva.

El Programa de Doctorado 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 este proyecto se obtuvo apoyo de beca CONACyT mediante el número de registro de beca 39046/CVU: 331183

El jurado designado por la comisión del posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, aprobó la tesis titulada "El estrés crónico leve impredecible altera el sistema de regulación neuroendocrina del apetito-saciedad, y produce estrés oxidante e inflamación sistémica en rata", con fecha de presentación para obtener el grado de Doctora en Biología Experimental el día 14 de julio del 2016.



---

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



---

Dra. Leticia Manuel Apolinar  
Área de endocrinología  
Unidad de Investigación Médica en enfermedades  
Endocrinas. Hospital de Especialidades  
Centro Médico siglo XXI. IMSS.  
(Secretaria)



---

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  
(Vocal)



---

Dra. María del Carmen Escobar Villanueva  
Departamento Ciencias de la Salud.  
Universidad Autónoma Metropolitana –Iztapalapa  
(Vocal)

## Agradecimientos

### **A mí amada familia:**

Por acompañarme y animarme a realizar uno más de mis sueños. Gracias por su amor incondicional, y aunque por ausencias no parezca, yo también los amo.

### **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 su voto de confianza y 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 de laboratorio:**

Los mejores asesores del momento, con los que se compartieron tristezas y alegrías, aquellos 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 la alegría de ser parte de mi historia, gracias por acompañarme y permanecer a mi lado.

## INDICE

Abreviaturas.....	8
Resumen.....	10
Abstrac.....	12
1.- Introducción.....	13
1.1.- Definición de estrés.....	13
1.2.- Clasificación del estrés.....	16
1.2.1.- Estrés agudo.....	17
1.2.2.- Estrés crónico.....	18
1.3.- Mecanismo de respuesta al estrés.....	18
1.4.- Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA).....	19
1.5.- Regulación del eje HHA.....	20
1.6.- Efecto de los Glucocorticoides (GCs).....	22
1.7.- Sistema nervioso Simpático-Adreno-Medular (SAM).....	24
1.8.- Regulación del sistema nervioso SAM.....	24
1.9.- Efecto de la adrenalina y noradrenalina.....	25
1.10.-Estrés y metabolismo.....	26
1.11.- Sistema neuroendocrino que regula el metabolismo, el apetito y la saciedad.....	27
1.12.- Estrés y el sistema de regulación neuroendocrina del apetito y la saciedad....	29
1.13.- Estrés oxidante.....	32
1.14.- Efecto del estrés fisiológico sobre el estrés oxidante.....	34
1.15.- Inflamación.....	35
1.16.- Tipos de inflamación.....	37
1.17.-Sistema inmune.....	38
1.18.- Respuesta del sistema inmunitario al estrés.....	39
1.19- Daño y muerte celular programada.....	42
2- Antecedentes.....	44
3.- Justificación.....	49
4.- Planteamiento del problema.....	51
5.- Hipótesis.....	51
6.- Objetivo general.....	51
6.1.- Objetivos particulares.....	51
7.- Material y métodos.....	52
7.1.- Inducción del estrés.....	52
7.2.- Evaluación de las hormonas leptina-grelina, insulina y corticosterona.....	54
7.3.- Análisis de los tejidos.....	54
7.3.1.- Extracción y cuantificación de proteína.....	54
7.3.2.- Receptor a leptina y receptor a grelina.....	55
7.3.3.- Glutatión (GSH).....	57
7.3.4.- Lipoperoxidación (LPO).....	57
7.3.5.- Superóxido dismutasa (SOD).....	57
7.3.6.- Catalasa (CAT).....	58

7.3.7.- Capacidad antioxidante total (TAC).....	58
7.3.8.- Oxidación de proteínas mediante Oxiblot.....	59
7.4.- Análisis de citocinas.....	59
7.5.- Análisis daño y muerte celular.....	60
7.6.- Análisis estadístico.....	60
8.- Resultados.....	60
8.1.- Efecto del estrés crónico en los niveles de corticosterona.....	60
8.2.- Efecto del estrés crónico en los niveles de insulina, leptina y grelina.....	60
8.3.- Efecto del estrés crónico en marcadores del sistema neuroendócrino que regula el apetito y la saciedad.....	61
8.4.- Efecto del estrés crónico en los niveles de GSH.....	62
8.5.- Efecto del estrés crónico en los niveles de LPO.....	62
8.6.- Efecto del estrés crónico en la actividad enzimática antioxidante de SOD y CAT.....	64
8.7.- Efecto del estrés crónico en los niveles de TAC .....	65
8.8.- Efecto del estrés crónico en los niveles de proteínas oxidadas.....	65
8.9.- Efecto del estrés crónico en los niveles de citocinas.....	67
8.10.- Efecto del estrés crónico en los marcadores de daño y apoptosis.....	68
9.-Discusión.....	69
10.-Conclusiones.....	80
11.-Perspectivas.....	81
12.-Bibliografía.....	82
13.- Artículo.....	93

## ***Abreviaturas***

11-  $\beta$ - HSD: Hidroxiesteroide deshidrogenasa  
ACTH: Hormona Adrenocorticotropina  
AGrP: Proteína Agouti  
AP1: Proteína Activadora 1  
APA: Asociación Americana de Psicología  
CART: Transcrito Regulado por Cocaína y Anfetaminas.  
CAT: Catalasa  
CCK: Colecistocinina  
CRH: Hormona Liberadora de Corticotropina  
DT2: Diabetes mellitus tipo 2  
ECLI: Estrés crónico leve impredecible  
GCs: Glucocorticoides  
GHS-R1: Receptor a grelina tipo 1a  
GLP 1: Péptido semejante a glucagón 1  
GR: Receptor a Glucocorticoides  
GRE: Elemento de respuesta a glucocorticoides  
GRP: Péptido liberador de gastrina  
GSH: Glutación reducido  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Peróxido de hidrógeno  
HHA: Hipotálamo Hipófisis Adrenal  
IFN- $\alpha$  y  $\beta$ : Interferon gama  
IFN- $\beta$ : Interferon beta  
IL-1  $\beta$ : Interleucina 1 beta  
IL-10: Interleucina 10  
IL-6: Interleucina 6  
INEGI: Instituto Nacional de Estadística y Geografía  
LPO: Lipoperoxidación  
MCH: Hormona concentradora de melanina  
MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad

MR: Receptor a mineralcorticoides  
NPY: Neuropeptido Y  
O<sup>2-</sup>: Anión superóxido  
Ob-R: Receptor a leptina  
OH: Radical hidroxilo  
OMS: Organización Mundial de la Salud  
PCNA: antígeno de proliferación ceular  
POMC: Propiomelanocortina  
PYY: Péptido YY  
RO: Radical alcoxilo  
ROO: Rádical peroxilo  
SAM: Sistema Simpático Adreno-Medular  
SOD: Superoxido dismutasa  
SOM: Somatostatina  
TAC: Capacidad antioxidante total  
TGB-β: Factor de crecimiento transformante  
TH/Cd4 : Linfocitos T  
TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa  
α MSH: Proteína estimuladora de melanocitos alfa

## **Resumen**

El estrés crónico es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas que son consideradas problemas de salud pública. Aunque la asociación entre estrés fisiológico y alteraciones metabólicas es comúnmente aceptada, los mecanismos de daño aún no han sido dilucidados y comprendidos. El modelo de estrés crónico leve impredecible (ECLI) ha sido utilizado para evaluar los efectos del estrés crónico sobre el organismo. En estudios previos hemos demostrado que el ECLI produce alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos entre los 40 y 60 días de tratamiento, pero se desconoce el efecto que tiene el estrés crónico sobre el sistema de regulación del apetito-saciedad, el estrés oxidante y la inflamación en dichas alteraciones. Por lo que el objetivo de este trabajo fue determinar la participación del sistema de regulación neuroendocrino del apetito-saciedad, del estrés oxidante y la inflamación sistémica en las alteraciones metabólicas inducidas por estrés crónico. Ratas macho Wistar de 3 meses de edad, fueron sometidas al modelo de estrés crónico leve impredecible por 20, 40 y 60 días. Para evaluar el efecto del estrés en el sistema que regula el apetito-saciedad, se determinaron niveles séricos de corticosterona, insulina, leptina y grelina, y se evaluó la presencia de los receptores de grelina (GHS-R1) y leptina (Ob-R) en hipotálamo. Para detectar la presencia de estrés oxidante y daño se evaluaron los niveles de glutatión reducido (GSH), lipoperoxidación (LPO), superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), capacidad antioxidante total (TAC), proteínas oxidadas y marcadores de apoptosis: procaspasa 3, caspasa 3, y citocromo c en hígado y páncreas. Para determinar el perfil inflamatorio se evaluaron citocinas séricas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10.

Los niveles de corticosterona estuvieron elevados desde los 20 y hasta los 60 días de tratamiento. Los niveles de insulina y grelina incrementaron a los 20 y 40 días respectivamente, mientras que los niveles de leptina disminuyeron desde los 20 días de ECLI. Por otro lado, también se observa una alteración en los niveles del receptor OB-R y GHS-R1 entre los 40 y 60 días de tratamiento, sugiriendo que en la progresión de las alteraciones metabólicas modificó algunas de las hormonas que regulan el apetito y saciedad. En hígado y páncreas se observan niveles reducidos de GSH entre los 40 y 60 días, mientras que LPO y las proteínas oxidadas aumentan en ambos tejidos, siendo el páncreas más susceptible al daño por especies reactivas. En cuanto al perfil inflamatorio encontramos los niveles de citocinas regulados entre los 20 y 40 días, pero a los 60 días se incrementan las citocinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6) y disminuye la anti-inflamatoria (IL-10), provocando una inflamación de bajo grado hacia los 60 días de ECLI. Los marcadores de apoptosis indican daño en páncreas, puesto que hay un aumento del citocromo c hacia los 60 días de tratamiento, mientras que en hígado aumentan

los niveles caspasa 3 solo a los 40 días. Estos datos sugieren que en las alteraciones metabólicas causadas por estrés crónico, también se alteran marcadores del sistema de regulación del hambre y la saciedad, que podrían estar favoreciendo el progreso de las alteraciones metabólicas. Las consecuencias del ECLI a los 60 días sugieren la presencia de estrés oxidante e inflamación sistémica, que causa daño a nivel tisular, y que a largo plazo podría asociarse con el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como la diabetes mellitus tipo 2.

## **Abstrac**

Chronic stress is considered a risk factor for the development of chronic degenerative diseases that are considered public health problems. Although the association between physiological stress and metabolic disorders is commonly accepted, damage mechanisms have not been elucidated and understood.

The model of chronic unpredictable mild stress (CUMS) has been used to assess the effects of chronic stress on the body. In previous studies we have shown that ECLI produces alterations in the metabolism of lipids and carbohydrates between 40 and 60 days of treatment, but the effect of chronic stress on the system of regulation of appetite and satiety and activation oxidative stress and inflammation is unknown in such alterations. The aim of this study was to determine the involvement of neuroendocrine regulation system of appetite and satiety, oxidative stress and systemic inflammation in metabolic alterations induced by chronic stress. CUMS consisted in randomly exposing the animals to different stressors. The effects of CUMS on corticosterone, insulin, ghrelin and leptin were evaluated in serum. Leptin and ghrelin receptors were measured in hypothalamic. In liver and pancreas was determined reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total antioxidant capacity (TAC) and protein oxidation. Likewise, cytokine serum levels (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10) were determined.

Corticosterone levels remained high and constant up to the end of the experimental period at 60 days. Insulin and ghrelin were elevated at 20 and 60 days of CUMS, while the leptin decreased at 40 and 60 days of stress. Furthermore, an alteration is also observed in the levels of both receptors between 40 and 60 days of treatment, suggesting that progression of metabolic disorders hormones that regulate appetite and satiety was modified. In liver and pancreas, GSH levels were decreased from day 40, while protein lipid peroxidation and protein oxidation were increased. This is the first work where pancreas redox state under chronic stress conditions is reported. Liver TAC was constant whilen pancreas it was reduced. Regarding inflammation markers, an increase in TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 levels was observed, while IL-10 levels were reduced due to CUMS, generating a systemic inflammation state. Apoptotic markers indicate damage in pancreas, since there is an increase of cytochrome c and procaspasa3 to 60 days of treatment, while liver levels increase caspase 3 only at 40 days. These data suggest that chronic stress alters the metabolism neuroendocrine level, changing levels of hormones that regulate appetite and satiety. CUMS consequences at day 60 suggest that oxidative stress and inflammation can contribute the development of chronic degenerative diseases like diabetes.

## **1.- Introducción**

Durante las últimas dos décadas los cambios en las condiciones laborales, sociales y económicas han suscitado un ambiente cada vez más exigente que provoca una vida acelerada acompañada en la mayoría de los casos por mala alimentación y sedentarismo, resultando en un estilo de vida estresante. El estrés es considerado un factor de riesgo de gran relevancia debido a cambios en el estilo de vida favorece la incidencia de enfermedades crónico degenerativas, en las cuales la situación del paciente se agrava con el paso de los años a consecuencia de la acumulación de daño provocado por la misma enfermedad (OMS, 2010).

Una enfermedad degenerativa es una afección en la cual la función o la estructura de los tejidos u órganos afectados empeoran con el transcurso del tiempo. Las enfermedades crónico degenerativas pueden ser clasificadas en cardiovasculares (hipertensión y aterosclerosis), metabólicas (diabetes tipo 2), neurodegenerativas (Alzheimer y Parkinson) y cáncer, entre otras. La Organización Mundial de la Salud (2010), las cataloga como las causas principales de mortalidad a nivel mundial. Cada año aumenta considerablemente el número de casos, además de que son las causas más frecuentes de incapacidad prematura, el tratamiento en la mayoría de los casos, representa gastos a la economía nacional y familiar. En México el INEGI reportó en el 2010 que las enfermedades crónico degenerativas con mayor causa de defunción son las enfermedades cardiovasculares provocando 105 144 decesos, la diabetes tipo 2 (DT2) (82964) y los tumores malignos (70240). Aunque se han propuesto diversas causas responsables del desarrollo de una de estas enfermedades, en este trabajo se aporta evidencia sobre los efectos del estrés crónico sobre el desarrollo de alguna de estas patologías.

### **1.1.-Definición de estrés**

La palabra estrés se utiliza en forma confusa y con múltiples significados. La respuesta fisiológica a un estímulo imprevisto o agresor suele denominarse estrés. A toda circunstancia o factor que altere la homeostasis se le denomina estresor, y puede provenir de naturaleza física (como el clima, el ruido o el esfuerzo físico) o

puede ser emocional (como el estado de ánimo, las relaciones personales, la situación o preocupación financiera). El primero en utilizar el término estrés fue Hans Selye (1936), que define al estrés como una respuesta inespecífica del organismo ante cualquier exigencia o estímulo nocivo que afecte el equilibrio. Años antes Claude Bernard (1859) ya había tratado de explicar cómo las células y tejidos de organismos multicelulares responden al estímulos, proponiendo que todos los organismos, por variados que sean, deben mantener constancia en el medio interno para conservar la vida (Fink, 2010). Años más tarde, Walter Cannon (1932) propuso el término homeostasis (del griego *homoios*, similar y *statis*, posición) para referirse a aquellos procesos fisiológicos que se mantienen constantes, pese al continuo intercambio de estímulos entre el medio interno y externo de un individuo. Además, Cannon también propuso las conductas de lucha o huida para describir la respuesta al miedo o al agente estresor. La definición utilizada en este trabajo lo describe como una respuesta fisiológica, bioquímica, cognitiva y conductual del organismo ante eventos que alteren su estado de equilibrio (López *et al.*, 2011).

Selye (1950) propuso que la respuesta del organismo ante condiciones de estrés se presenta en tres etapas, denotadas en conjunto como Síndrome General de Adaptación:

1. Reacción de alarma. 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.

2. 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 depresión del sistema inmune.

3. Fase de agotamiento. Se caracteriza por disminución progresiva de la respuesta del organismo frente a una situación de estrés prolongado, que conduce a un estado de gran deterioro fisiológico, en el cual el sujeto reduce al mínimo su capacidad de habituación, ocasionando agotamiento físico e incluso la muerte (Selye, 1950).

En la formulación del síndrome General de adaptación propuesto por Selye (1936, 1950) se planteó 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 estresantes, 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 lo tanto, la respuesta al estrés se puede representar en varias etapas, como se ilustra en la figura 1.

Por otro lado, McEwen (2002) propone los términos alostasis y carga alostática para referirse a los procesos de habituación. De esta manera, ante un estresor, la activación de la respuesta fisiológica puede depender de varios factores, como: naturaleza del estresor, edad del individuo receptor, su experiencia y su genética (Figura 2).

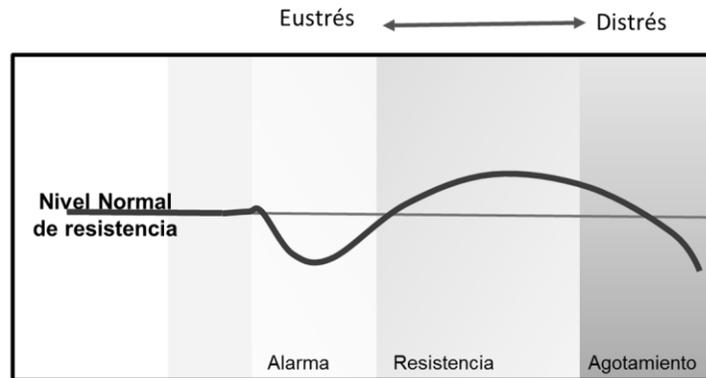


Figura 1. Representación gráfica de las etapas de respuesta al estrés propuesto por Selye en el Síndrome General de Adaptación (1976).

Estos factores, a su vez, determinan la respuesta conductual para enfrentar al estresor, que puede ser de lucha, huida o enfrentamiento, en los cuales la alostasis se refiere a la capacidad 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 o alteración causado por el estresor, por un periodo de tiempo (McEwen, 2015). Aunque la formulación del concepto estrés ha causado controversia, se ha llegado a consensar que la respuesta al estrés depende de la intensidad, duración y calidad del estresor, así como de las características fisiológicas y emocionales del individuo (McEwen y Wingfield, 2003; Dallman, 2007). A todo estímulo o factor que altere el estado de equilibrio se le denomina estresor (Selye, 1950). Los estresores pueden clasificarse dependiendo de la intensidad, la duración y la naturaleza del estresor.

### **1.2.-Clasificación del estresor**

De acuerdo con la intensidad de la respuesta los estresores se clasifican en leves, moderados y graves o excepcionales (traumáticos). Lo cual depende de factores como la edad, genética y experiencia del sujeto para percibir las señales del estresor y poder anticiparse para generar una respuesta conductual y fisiológica, con el fin de aminorar y controlar sus efectos; también pueden ser clasificados en predecibles e impredecibles, que influyen en la intensidad y el control de la respuesta (Koolhass *et al.*, 2011).

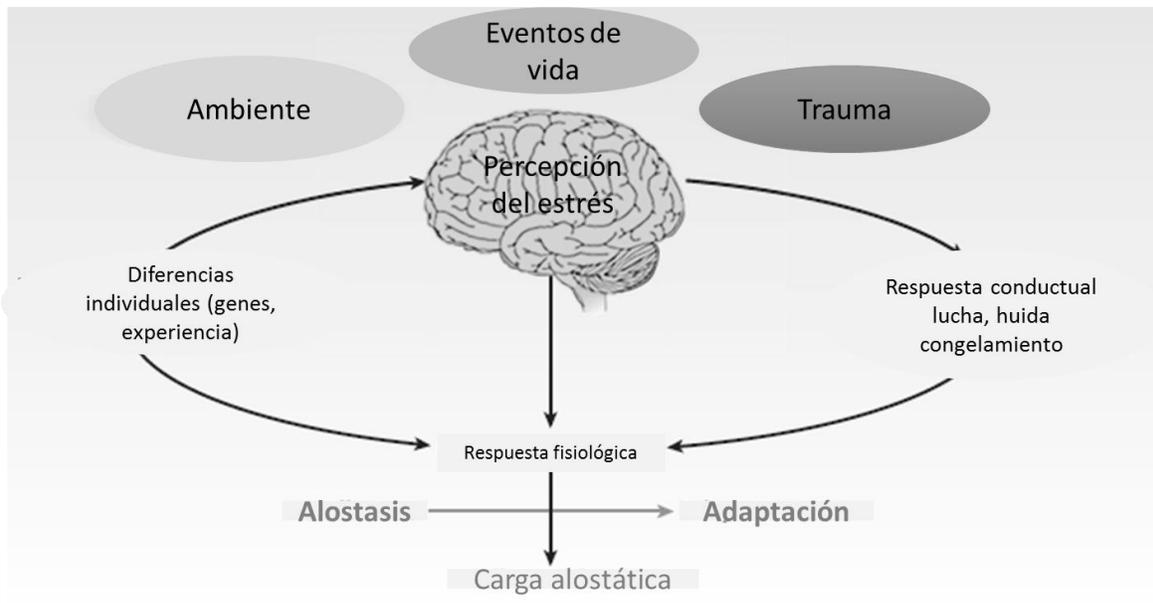


Figura 2. La respuesta al estrés y el desarrollo de la carga alostática. La respuesta al estrés difiere en cada individuo debido a que factores externos como la edad, la experiencia y la carga genética influyen en la manera en que se perciben y manejan los estímulos considerados estresantes. (Modificado de McEwen, 2015).

Considerando la duración del estresor, el estrés se puede clasificar en agudo y crónico.

### 1.2.1.-Estrés Agudo

Se presenta cuando un estímulo inesperado, ya sea físico o emocional, es limitado en el tiempo y da lugar a una respuesta también intensa, rápida y algunas veces violenta. Se ha propuesto que la utilización del término agudo se limita a los casos en donde existe una exposición única ante una situación estresante y tiene un tiempo de duración de segundos aunque sus efectos pueden mantenerse horas. En ocasiones el estrés agudo es acompañado de sensaciones eufóricas en pequeñas dosis, sin embargo aunque no siempre es eufórico y no causa daños importantes si puede causar algunos síntomas: agonía emocional (enojo, irritabilidad, ansiedad y depresión), problemas musculares (dolor de cabeza, mandíbula, espalda o ligamentos), problemas estomacales (acidez, diarrea, estreñimiento o síndrome de intestino irritable), o sobreexcitación pasajera que cause alteración en la presión

arterial, ritmo cardiaco, sudoración, mareos, hiperventilación o insomnio (McEwen y Winfield, 2003; APA, 2016).

### **1.2.2.-Estrés crónico**

Se produce ante una exposición continua a factores estresantes externos o condiciones prolongadas de la respuesta al estrés. El tiempo de estas situaciones se presenta en un periodo de horas, semanas e incluso años. El estrés crónico incorpora varios elementos, entre los cuales se encuentran los cambios en el medio ambiente, social o personal del individuo, también llamados eventos de vida (McEwen, 2002).

La exposición del individuo ante los agentes estresantes durante días, meses o años, genera inicialmente alteraciones fisiológicas como trastornos gastrointestinales, colitis nerviosa, gastritis, hipertensión arterial, ansiedad, frustración, insomnio, migraña, agresividad, entre otras. Sin embargo, la persistencia crónica produce finalmente serias alteraciones de carácter psicológico, como disfunción familiar, conductas antisociales y depresión (APA, 2016); falla de órganos vitales e incluso desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como artritis reumatoide, Alzheimer y enfermedad cardiovascular, que sea sugerido se desarrollan en muchas ocasiones con participación del estrés crónico (McEwen y Winfield, 2003). Independientemente del tipo de estrés, la respuesta se ejecuta a través de dos sistemas: El eje hipotálamo hipófisis adrenal y el sistema nervioso simpático.adrenomedular.

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

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 córtico-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 el neural (Brown, 1994).

La base esencial del mecanismo hormonal es la liberación de glucocorticoides (GCs), principalmente cortisol (en humanos) o corticosterona (en roedores), por las glándulas adrenales, mediante la activación del eje HHA. El mecanismo neural actúa mediante neurotransmisores directa o indirectamente sobre el hipotálamo y, desde sus centros vegetativos (núcleo paraventricular, lateral, periventricular), 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).

#### ***1.4.-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 3). El hipotálamo está constituido por diferentes regiones denominadas núcleos hipotalámicos, compuestos por células neuroendocrinas y reciben señales mediante fibras aferentes de diferentes partes del cerebro, principalmente del hipocampo (Fink, 2010). Estas fibras pueden ser dopaminérgicas, noradrenérgicas, serotoninérgicas y GABA-érgicas, entre otras. El hipotálamo envía señales mediante 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 (Brown, 1994). El eje HHA se activa cuando las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo secretan las hormonas liberadora de corticotropina (CRH) y arginina-vasopresina (AVP), que se transportan a través de los capilares del sistema circulatorio portahipofisario al órgano blanco, las células corticotróficas de la adenohipófisis (Brown, 1994; Gunnar y Quevedo, 2007; Fink, 2010).

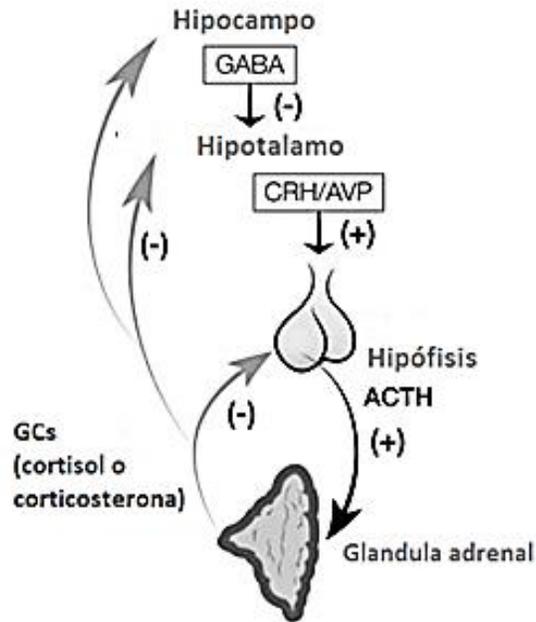


Figura 3. Eje hipotálamo hipófisis adrenal (HHA) y las estructuras involucradas en su regulación. (+): Rutas de activación. (-): Rutas de inhibición. El incremento de los glucocorticoides (GCs) es iniciado por un aumento en circulación de CRH y AVP, proveniente de la región medial parvo celular en el núcleo paraventricular del hipotálamo. La regulación por retroalimentación negativa opera a través del aumento de GCs circulantes en hipocampo e hipófisis. ACTH: Hormona adrenocorticotrófica. GABA: Ácido gamma aminobutírico.

Cuando el hipotálamo libera CRH, ésta es transportada por el sistema portahipofisiario para estimular 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 GCs en respuesta a la ACTH (Fink, 2010). 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 (Fink, 2010; Andrews *et al.*, 2011).

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).

El estrés crónico altera el funcionamiento del eje HHA y se ha propuesto que un alto nivel de glucocorticoides circulantes participa en la etiología y progresión de desórdenes neurales y metabólicos (Reagan *et al.*, 2008), debido a que los glucocorticoides ejercen su acción en la regulación y expresión de genes que participan en el control del metabolismo o en funciones necesarias para la sobrevivencia (Chrousos, 2009).

### **1.5.-Regulación del eje HHA**

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 hormona liberadora de corticotropina (CRH) está constituida por 41 aminoácidos. Actúa fijándose a receptores específicos de las células corticotrópicas, y únicamente estimula la liberación en presencia de calcio (Brown, 1994). CRH es sintetizada en el hipotálamo y llega a las células productoras de ACTH de la hipófisis anterior a través del sistema portahipofisario.

La ACTH es un péptido de 39 aminoácidos que estimulan 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; Cosio, Torrego y Adcock, 2005).

Los receptores activados se transportan al núcleo de la célula, donde interactúan con elementos de respuesta a glucocorticoides (GRE) y ejercen su acción al activar o reprimir factores de transcripción. El cortisol regula factores de transcripción como CREB (proteína ligadora de AMPc), FABP (proteína ligadora de ácidos grasos), PPAR $\gamma$  (Receptores activados por proliferadores de peroxisomas), UCP (Proteínas

desacoplantes de fosforilación oxidativa), 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 proinflamatorias (Cosio, Torrego 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 (Reagan *et al.*, 2008).

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).

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

Existen dos tipos de receptores a GCs: el receptor a mineralcorticoides (MR) y el receptor a glucocorticoides (GR) (Lu *et al.*, 2006). Los GCs tienen más afinidad hacia el MR, cuya activación es precautoria y esta regulada por el ritmo circadiano de los GCs: Por otro lado la activación de GR responde a la respuesta al estrés. (Machado, 2016; Hapgood, 2016). Los GCs realizan sus acciones a través de la unión al receptor nuclear. Cuando la hormona se une al RG, se libera de sus interacciones con las proteínas de choque térmico (Hsp70 y Hsp90) (Beck *et al.*, 2015), que lo mantienen inactivo. La activación tiene como resultado la formación de dímeros, los cuales se unirán al ADN en el GRE (De Kloet *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2006; Hapgood, 2016).

El RG puede presentarse en 2 isoformas moleculares diferentes, el RG $\alpha$  y el RG $\beta$ , con 777 y 742 aminoácidos, respectivamente (Cosio, Torrego 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 (splicing o corte y empalme) del pre-RNA $m$  del RG, y difiere de la isoforma  $\alpha$  tan sólo en los últimos aminoácidos del extremo C-terminal (Cosio, Torrego 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 RM y al RG; teniendo mayor afinidad al RM, lo que es fundamental en la regulación, tanto de las respuestas basales como del sistema HHA (Machado, 2016). Debido a sus afinidades diferenciales de GCs, el RM se encuentra ocupado de un 80% al 90% cuando los GCs se encuentran en rangos basales (De Kloet *et al.*, 2005).

Los GCs, 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 se conocen otras acciones que 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 cuando detecta la aproximación de un estresor (Machado, 2016).

2. Acciones supresoras: son las atribuibles al aumento de las concentraciones de GCs por el estrés y, por lo tanto su efecto es tardío, aproximadamente una hora o más después del inicio de la respuesta al estrés. Estas acciones están encaminadas a responder al estímulo estresante.

3. Acciones estimulantes: Los GCs pueden potencian el efecto de las primeras hormonas liberadas en la respuesta al estrés (Salposky *et al.*, 2000).

4. Acciones preparativas: son acciones que no están atribuidas a la presencia inmediata del estresor, pero modulan y preparan al individuo para un estresor subsecuente o posterior.

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

El sistema nervioso SAM es un componente del sistema nervioso autónomo que regula la liberación de catecolaminas en la médula adrenal. 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 (Charmandari, 2005; Gunnar y Quevedo, 2007).

### **1.8.-Regulación del Sistema Nervioso SAM**

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 (Brown, 1994). 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 esplécnico, secretan catecolaminas, principalmente adrenalina (80%) y noradrenalina (20%) (Gunnar y Quevedo, 2007).

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

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 (aumentan la tasa, el volumen sistólico y provocan vasodilatación en los músculos), la constricción de los vasos sanguíneos en la piel y el intestino (Charmandari, 2005); estos cambios garantizan el suministro de sangre y energía tanto al cerebro como a los músculos.

La adrenalina es una monoamina producida sólo por las glándulas suprarrenales a partir de los aminoácidos fenilalanina y tirosina. El efecto metabólico de la adrenalina es estimular la glucogenólisis en el hígado, movilizar reservas y dar 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 y así controlar la respuesta de lucha, huida o congelamiento (Stratakis y Chrousos, 1995).

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), éste 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.

Una variedad de eventos estresantes que implican componentes físico-emocionales, causan un marcado aumento en la liberación de noradrenalina en varias regiones del cerebro. Tanaka (2000) demostró que el estrés por inmovilización provocó un aumento de la secreción de noradrenalina en hipotálamo, amígdala y locus coeruleus. Este aumento provocó ansiedad y miedo en los animales. Por otro lado, la administración de un ansiolítico previo a la inmovilización atenuó la respuesta de estrés, disminuyendo los niveles de noradrenalina Tanaka

(2000). De este trabajo se concluyó que los estresores que implican factores físico-emocionales, provocan un aumento en la liberación de noradrenalina (Tanaka, 2000).

Otro aspecto relevante es la temporalidad de la respuesta al estrés. 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 tardíos, además de que pueden continuar ejerciendo su efecto por períodos de tiempo más prolongados (De Kloet *et al.*, 2005). Sin embargo, la intensidad y duración de la respuesta dependerá del tipo de estresor, el tiempo de exposición al mismo y la constitución fisiológica de cada individuo, además de la forma en la que el individuo maneje el componente emocional que le genere el estresor percibido (Koolhaas *et al.*, 2011).

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 debido a las reacciones oxido-reducción en la mitocondria de la célula, 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, propiciando condiciones de estrés oxidante (Kamper *et al.*, 2009).

### **1.10.-Estrés y metabolismo**

La respuesta al estrés involucra una compleja interacción sistémica en la que, inicialmente, el objetivo principal es proveer un ambiente energético para enfrentar al estresor. Esto involucra la activación de rutas metabólicas como la gluconeogénesis, glucogenólisis y lipólisis, por acción de los GCs y las catecolaminas (Stratakis y Chrousos, 1995). En este contexto dos órganos que están involucrados en la regulación de los niveles de glucosa en sangre son el hígado, que actúa como un moderador sistémico y el páncreas, que responde a los cambios metabólicos secretando insulina; se ha visto que la respuesta de ambos tejidos se ve modificada por efecto del estrés crónico (López *et al.*, 2011).

La respuesta al estrés se caracteriza por circulación constante de altas concentraciones de glucosa. Por otro lado la hiperglicemia crónica se relaciona con las complicaciones presentes en enfermedades metabólicas crónico degenerativas como la DT2 (Díaz *et al.*, 2004), por lo que la hiperglicemia crónica puede anteceder este tipo de enfermedad. Además algunos estudios sugieren que las experiencias estresantes pueden afectar el inicio y el control metabólico de la diabetes (Surwit, 2002). Sin embargo, esta relación sólo se ha sugerido a través de estudios retrospectivos, los resultados no han sido del todo concluyentes. Otros estudios, como los de Zardooz (2006), han intentado demostrar la participación del estrés crónico inducido en modelos animales mediante restricción de movimiento sobre la alteración del metabolismo de carbohidratos. En este estudio, aunque se reportó una modificación en el manejo de carbohidratos después de 30 días, los animales exhibieron habituación, probablemente debido al tipo de estresor utilizado. Los modelos con estresores repetitivos pueden presentar limitaciones debido a habituación cuando se utilizan por periodos prolongados de tiempo.

Aunque el aumento de glucosa puede ser considerado un factor importante en la regulación del metabolismo, se sabe que el control metabólico también se lleva a cabo por vías de señalización sistémica y neurendócrinas que se conjuntan en el hipotálamo, y que involucran acciones conductuales como el apetito y la saciedad, que resulta del aumento o disminución de glucosa circulante.

### ***1.11.-Sistema neuroendocrino que regula el metabolismo, el apetito y la saciedad***

El hambre, la saciedad y el balance energético se regulan por un sistema neuroendocrino integrado a nivel del hipotálamo. Varios núcleos hipotalámicos están involucrados en el control del peso corporal y la conducta alimenticia (núcleo arcuato localizado en la base del hipotálamo, núcleo lateral, los núcleos ventro y dorso medial) que inervan al núcleo paraventricular (Brown, 1994). Los avances en la investigación acerca de la regulación del apetito-saciedad han permitido identificar un número creciente de moléculas implicadas en dichos circuitos, que podemos clasificar dependiendo su acción en orexigénos o estimulantes del apetito

cuyos principales moduladores son: grelina, Neuropeptido Y (NPY) y la Proteína Agouti (AgrP); y aquellas que tienen actividad anorexígena y que inhiben el apetito: Colecistocinina (CCK), enterostatina, péptido semejante a glucagón (GLP-1), Somatostatina, Amilina, Péptido liberador de gastrina (GRP), Péptido YY (PYY), Leptina, Insulina, entre otras (González, 2006, Diz-Chaves, 2011).

Muchas de ellas son sintetizadas en sistemas endocrinos como el tejido adiposo, el tracto gastrointestinal, el páncreas y el sistema nervioso central, dichas interacciones se muestran en la figura 4.

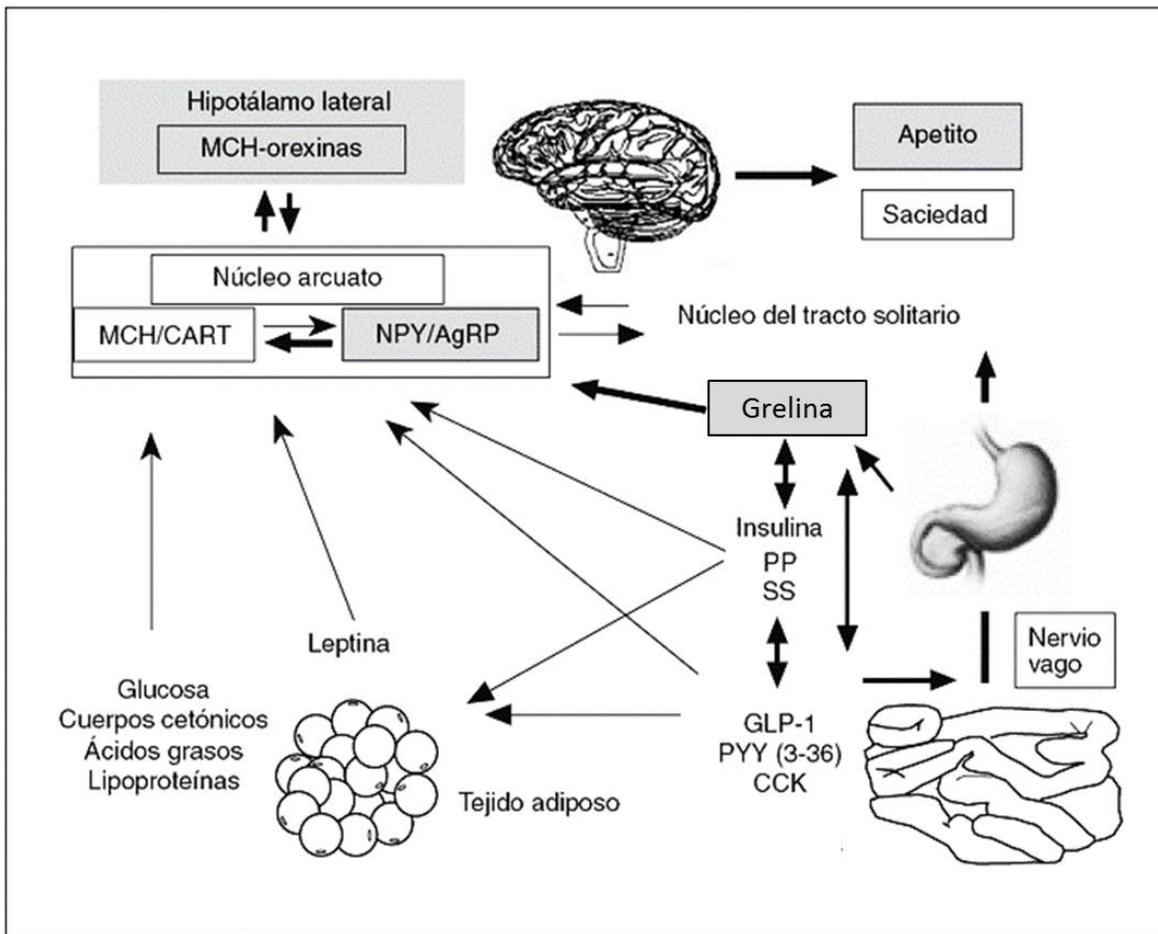


Figura 4. La regulación de la ingesta alimentaria se lleva a cabo mediante una compleja red funcional en la que participan tanto señales neurales como humorales, que interconectan funcionalmente a nivel sistémico del tejido adiposo, intestino, estómago y páncreas, implicados en la homeostasis del estado nutricional. Algunas moléculas implicadas en la regulación del apetito y la saciedad. NPY: neuropeptido Y; AgRP: proteína relacionada con agouti; MCH: hormona concentradora de melanina; CART: transcriptor regulado por cocaína y anfetamina; PYY (3-36): péptido tirosina-tirosina; CCK: colecistocinina; GLP-1: péptido parecido al glucagón tipo 1, modificado de Fruhbeck, 2005.

La sensación de apetito o saciedad surge de la interacción entre señales periféricas provenientes del aparato digestivo, tejido adiposo y páncreas, que se integran en el núcleo del tracto solitario, ubicado en el tronco cerebral y neuronas sensoras del hipotálamo; este es el principal núcleo sensorial (Brown, 1994). Un estómago vacío secreta la hormona grelina que activa neuronas del hipotálamo lateral productoras de péptidos orexigénicos (NPY y AgRP). El comer desencadena toda una serie de reacciones que se inician con las sensaciones del olfato y el gusto enviando señales hacia la región orbitosensorial de la corteza, la amígdala y al hipocampo que a su vez señalizan al hipotálamo. Al comer se inhibe la secreción de grelina; pero la absorción de nutrimentos a través del intestino libera CCK, la cual disminuye el vaciamiento gástrico y aumenta la secreción de enzimas pancreáticas. Conforme aumenta el contenido de glucosa en la sangre, se secreta insulina del páncreas activando el almacenamiento de reservas energéticas en hígado (induciendo la glucogénesis). Mientras que del tejido adiposo se secreta entonces leptina, que controla el estado de las reservas energéticas y reactiva el gasto energético (González, 2006).

Los efectos principales de la leptina e insulina son la inhibición de la ingesta alimenticia e incremento del gasto energético (Niswender, 2004), estos efectos están mediados por la reducción en la expresión de neuropéptidos orexigénicos como el NPY y el incremento de la expresión de los péptidos anorexigénicos, tales como la  $\alpha$ MSH, la CRH y el transcrito regulado por cocaína y anfetaminas (CART) (Figura 4).

### ***1.12.-Estrés y sistema de regulación neuroendocrina del apetito- saciedad***

La circulación de moduladores de del metabolismo a nivel del sistema nervioso central incluye la leptina, insulina, grelina y los niveles de glucosa. Las dos subpoblaciones neuronales del núcleo arcuado contienen receptores de insulina y leptina (Ob-R) (Vazquez, 2006). Los efectos de esta última están mejor caracterizados que los de la insulina (Niswender, 2004). El receptor a insulina esta presente en SNC en dos isoformas: A y B (Niswender, 2004), pero no se tiene un tipo específico para el hipotálamo. Por otro lado los receptores a leptina se localizan

en el hipotálamo, se conocen tres formas del receptor: la forma larga (Ob-R), la corta y la soluble. La forma larga se expresa exclusivamente en hipotálamo (Vázquez, 2006).

Se considera que la leptina tiene un papel más importante que la insulina en la regulación de la homeostasis energética, puesto que la deficiencia de leptina (mutación ob/ob en ratones) y mutaciones en sus receptores (mutación fa/fa y db/db en ratas) causan obesidad severa con hiperfagia que persiste aún con elevados niveles de insulina (González, 2006; Arora, 2007). Las variaciones en los receptores de leptina puede participar en complicaciones metabólicas presentes en pacientes obesos originada por deficiencia de la proteína transportadora en la barrera hematoencefálica o por defecto en la señalización intracelular de la leptina (González, 2006). Por otro lado se ha visto que el aumento circulante de cortisol reduce los niveles de leptina (Crispin, 2007). Con el modelo de estrés crónico leve impredecible y fracaso social, se ha visto una reducción significativa en los niveles de leptina, por lo que su disminución también se asocia con trastornos en el estado de ánimo como la depresión (Brito, 2007).

Cuando disminuyen los niveles circulantes de leptina y su receptor, incrementan los niveles circulantes de grelina y su receptor (Crispin, 2007). El receptor secretagogo de la hormona de crecimiento (GHS-R) es el receptor a grelina, y del cuál se conocen dos isoformas GHS-R 1a, que consta de 366 aminoácidos y siete dominios transmembrana, y GHS-R 1b, que consta de 289 aminoácidos y 5 dominios transmembrana, siendo la forma GHS-R 1a la funcional en hipotálamo (Rincón, 2007). La activación del receptor GHS-R1a induce la expresión de NPY y AgrP en el núcleo arcuato, para estimular el hambre (González, 2006; Rincón, 2007).

Existe una relación entre la respuesta del eje HHA y las variaciones en el sistema de regulación neuroendocrino del hambre y la saciedad (Cintra, 2007). La pérdida de peso corporal y la reducción de la ingesta de alimentos pueden ser considerados marcadores fiables de la gravedad del estrés, al menos en ratas (Adam, 2007). En los humanos se muestra que bajo condiciones de estrés aproximadamente 30% de las personas disminuye la ingesta de alimento y pierde peso, estos resultados son

controversiales debido a que también se ha reportado un efecto contrario en donde las personas aumentan su ingesta de alimentos durante el estrés (Stone y Brownell, 1994). El estrés puede llevar a una disminución o a un incremento en la ingesta de alimento y el peso corporal, dependiendo del tipo de estresor, su intensidad y su duración (Adam, 2007).

La modificación en la respuesta energética puede activar la respuesta al estrés, se ha visto un aumento en los niveles de glucocorticoides en condiciones de hipoglucemia (González, 2006; Sánchez, 2007). Se considera que la leptina tiene un papel más importante que la insulina en la regulación de la homeostasis energética, puesto que la deficiencia de leptina (mutación *ob/ob* en ratones) y mutaciones en sus receptores (mutación *fa/fa* y *db/db* en ratas) causan obesidad severa con hiperfagia que persiste aún con elevados niveles de insulina (González, 2006; Arora, 2007). Las variaciones en los receptores de leptina puede participar en complicaciones metabólicas presentes en pacientes obesos originada por deficiencia de la proteína transportadora en la barrera hematoencefálica o por defecto en la señalización intracelular de la leptina (González, 2006). Por otro lado se ha visto que el aumento circulante de cortisol reduce los niveles de leptina (Crispin, 2007). Con el modelo de estrés crónico leve impredecible y fracaso social, se ha visto una reducción significativa en los niveles de leptina, por lo que su disminución también se asocia con trastornos en el estado de ánimo como la depresión (Brito, 2007).

A pesar de la evidencia sobre los desbalances hormonales a consecuencia del estrés, se siguen obteniendo resultados contradictorios que complican dichas asociaciones, sin embargo las alteraciones metabólicas, que pueden ser producto de un desbalance hormonal a nivel neuroendócrino, se han asociado con la generación de estrés oxidante, existen estudios mediante los cuáles se observa que en situaciones de desbalance metabólico, como puede ser la obesidad, síndrome metabólico o incluso la hiperglucemia crónica (Díaz *et al.*, 2004; Cintra, 2007) se presenta un aumento en la formación de especies reactivas que pueden causar estrés oxidante e inflamación.

### **1.13.-Estrés oxidante**

El estrés oxidante a nivel celular se caracteriza por la presencia en exceso de radicales libres. Un radical libre es una especie química que tiene en su última capa uno o más electrones desapareados, lo que los vuelve inestables y altamente reactivos. Los radicales libres pueden derivarse de oxígeno (especies reactivas de oxígeno o ERO) o de nitrógeno (especies reactivas del nitrógeno). Las ERO son radicales libres donde el electrón desapareado se sitúa predominante en el átomo de oxígeno; habitualmente el oxígeno se encuentra en su forma más estable, la molécula diatómica  $O_2$ , presentando los electrones que forman parte del enlace  $\pi$  en el mismo espín (estado triplete) (Konigsberg, 2007).

Por su parte, el radical anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) es la forma dominante del oxígeno a pH fisiológico, formándose en el metabolismo aerobio entre 1-2%. Por ser inestable, este anión propicia reacciones que dan lugar a otros intermediarios más reactivos. Así por ejemplo, se pueden generar reacciones de dismutación entre dos radicales superóxido para generar peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno. Este  $H_2O_2$  no es un radical libre, pero su toxicidad es importante ya que atraviesa con facilidad las membranas celulares. El  $H_2O_2$  está implicado en la regulación de la transducción de la señal que lleva a la expresión de genes a través de factores de transcripción tales como el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B) y la proteína activadora 1 (AP-1), capaces de inducir la expresión de interleucina 2 (IL-2), TNF- $\alpha$ , antígenos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y el protooncogen c-fos (Sen y Packer, 1996).

El radical hidroxilo ( $OH^{\cdot}$ ) es la especie química más reactiva que se conoce y, por tanto, la más tóxica. Tiene una vida media estimada de alrededor de  $10^{-9}$  segundos. Puede formarse in vivo como consecuencia de radiación de alta energía (rayos X, rayos  $\gamma$ ) (Konigsberg, 2007). Uno de los procesos más importantes de producción de  $OH^{\cdot}$  es mediante las reacciones de Fenton y Haber Weiss, en las cuales se lleva a cabo la reducción del  $H_2O_2$  por ciertos iones metálicos. 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, produciendo el radical peroxilo ( $ROO\bullet$ ) y el malondialdehído, como productos del daño a las membranas lipídicas en el proceso de lipoperoxidación (LPO) (Konigsberg, 2007).

Los radicales libres también se pueden producir en el interior celular durante el transporte de electrones a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial. Así mismo, la dieta, el humo de tabaco, la polución ambiental y el ozono son factores que influyen en su formación. Para contrarrestar el daño producido por los radicales libres el organismo cuenta con sistemas de defensa antioxidante, cuyo principal objetivo es restablecer el equilibrio entre los mecanismos oxidantes.

Los mecanismos antioxidantes implican la participación de moléculas que neutralizan las reacciones ocasionadas por los radicales libres. Los mecanismos antioxidantes pueden ser enzimáticos y no enzimáticos. En los mecanismos enzimáticos participan las enzimas: superóxido-dismutasa (SOD), catalasa (CAT) y glutatión peroxidasa (GSHpx). Por su parte, en los mecanismos no enzimáticos se cuenta con la participación de las vitaminas A, C y E, glutatión reducido (GSH), ácido lipoico, carotenoides, vitaminas B1, B2, B6 y B12 (Johansen *et al.*, 2005; Konigsberg, 2007).

El GSH contribuye a mantener el poder antioxidante de enzimas como la GSHpx, la vitamina C y la vitamina E (Johansen *et al.*, 2005). La alteración del balance entre las ERO y antioxidantes puede tener diversos grados de magnitud. Cuando el estrés oxidante es crónico se producen alteraciones en el metabolismo celular, como rompimiento del DNA, aumento de la concentración de calcio intracelular, descompartmentalización de iones  $Fe^{+2}$  y  $Cu^{+2}$  catalíticos, daño a los transportadores membranales de iones, oxidación de proteínas específicas y LPO. Cabe señalar que la efectividad de los sistemas de defensa antioxidantes dependen de factores como los genéticos, la edad y el estado nutricional (Johansen *et al.*, 2005).

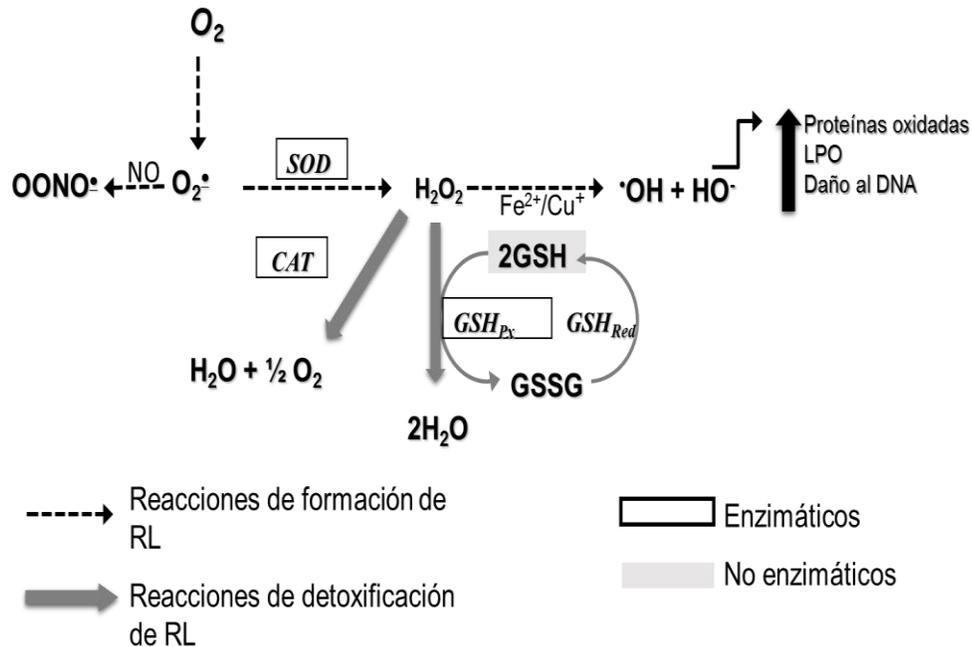


Figura 5. Representación del proceso de formación de especies reactivas de oxígeno, participación de antioxidantes y producción de estrés oxidante. SOD: superóxido dismutasa; CAT: catalasa; GSHpx: glutatión peroxidasa; GSH: glutatión reducido; GSHred: glutatión reductasa; GSSG: glutatión oxidado; LPO: lipoperoxidación.

### 1.14.-Efecto del estrés fisiológico sobre el estrés oxidante

Varios modelos animales se han desarrollado para crear situaciones de adversidad en un animal de experimentación, el cual puede ser sometido tanto a desafíos físicos como sociales (Bonilla, *et al.*, 2000). Existen diferentes tipos de modelos de inducción del estrés, como son: inmovilización, frío, inmersión en agua fría, choques eléctricos o combinaciones de éstos, uno de los cuales se conoce como estrés crónico leve e impredecible (ECLI).

Estudios de estrés crónico a 21 días utilizando modelos de inmovilización, frío e inmersión en agua fría se han sido asociados con estrés oxidante en eritrocitos, hígado, riñón, corazón, cerebro, estómago y pulmón (Gümüşlü, 2007; Lucca *et al.*, 2009). Esta asociación se deriva de estudios en los que la administración crónica de corticosterona muestra efectos adversos en el organismo, en los que podría estar involucrado el estrés oxidante (Zafir y Banu, 2009). Se ha demostrado que los glucocorticoides participan en el incremento del estrés oxidante en hipocampo y

corteza cerebral (You *et al.*, 2009; Hiroya *et al.*, 2010). De hecho, los glucocorticoides y la actividad de su eje regulador HHA participan en la regulación de la respuesta inmune e inflamatoria (Yeager *et al.*, 2004). Sin embargo, la desventaja de los modelos como la inmovilización o la inmersión en agua fría es que, al ser continuos y repetitivos, pueden favorecer la habituación, modificando probablemente la intensidad y la presencia de marcadores de la respuesta al estrés lo que impide observar la progresión de dichas alteraciones.

También se ha encontrado que el estrés oxidante contribuye a la degeneración neural del SNC, en el envejecimiento y en enfermedades crónico degenerativas, como la esclerosis amitrófica lateral, Alzheimer y enfermedad de Parkinson (Gümüşlü, 2007; Lucca *et al.*, 2009; Hiroya *et al.*, 2010). Por otro lado la sobreproducción de GCs se relaciona con estrés oxidante, apoptosis y pérdida de los receptores a glucocorticoides en las células CA3 del hipocampo, lo que perjudica el proceso de aprendizaje y la consolidación de la memoria (Hiroya *et al.*, 2010). A pesar de que varias estructuras cerebrales y órganos se han asociado con la generación de daño por estrés oxidante debido a estrés fisiológico, no hay evidencias del efecto del estrés crónico en los niveles de antioxidantes y marcadores de estrés oxidante en páncreas, que es un órgano implicado en la patogénesis de enfermedades metabólicas crónico degenerativas, incluyendo la DT2.

### **1.15.-Inflamación**

El proceso inflamatorio se entiende como una manifestación de un estado de enfermedad corporal, controlada por el sistema inmune. La respuesta inflamatoria se presenta de manera inespecífica frente a agresiones del medio, y es generada por los agentes inflamatorios que son pequeñas moléculas de diferente procedencia: lipídica (prostaglandinas, leucotrienos y tromboxano), aminoácidos modificados (histamina, serotonina) y pequeñas proteínas (citoquinas, factores de crecimiento e interleucinas) (Hotasmilingil, 2006). La respuesta inflamatoria se activa con el objetivo de aislar y destruir al agente dañino, así como reparar el tejido u órgano dañado.

Uno de los principales mediadores del proceso inflamatorio son las citocinas, que son glicoproteínas de bajo peso molecular, producidas en su mayoría por células del sistema inmune. Se unen a receptores específicos en la superficie celular de manera transitoria, cambiando el patrón de expresión genética de las células blanco. Se conocen alrededor de 200 citocinas con acciones biológicas y orígenes ampliamente variados, a menudo con superposición o redundancia funcional. Se sabe que actúan en grupos o cascadas regulando muchos procesos inmunobiológicos y homeostáticos, tales como la hematopoyesis, proliferación, diferenciación celular y apoptosis (Klinger, 2005).

Las citocinas se clasifican dependiendo del efecto que provocan en pro-inflamatorias y anti-inflamatorias. (Klinger, 2006). Las citocinas proinflamatorias son: IL-11, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-18, interferones alfa y beta (IFN- $\alpha$  y  $\beta$ ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (Klinger, 2005). Sus acciones proinflamatorias son atenuadas por citocinas antiinflamatorias IL-10, IL-13 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Standford, 2000; Klinger, 2005). Aunque también hay citocinas como IL-6 que mantienen un papel dual, dependiente de la concentración y el tiempo (León *et al.*, 2015). La inflamación puede ser originada por factores endógenos (necrosis tisular o rotura ósea) o factores exógenos como lesiones por agentes mecánicos (corte), físicos (quemaduras), químicos (corrosivos), biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad).

En la respuesta inflamatoria también participan componentes del plasma sanguíneo, células circulantes, vasos sanguíneos y constituyentes celulares y extracelulares del tejido conectivo como son los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas (León *et al.*, 2015). Las células del tejido conectivo son los mastocitos, que rodean los vasos sanguíneos y los fibroblastos. La matriz extracelular consiste en proteínas fibrosas estructurales (colágeno, elastina), glicoproteínas adherentes (fibronectina, laminina, entactina, tenascina entre otras) y proteoglicanos. La membrana basal es un componente especializado de la matriz extracelular que consiste en glicoproteínas adhesivas y proteoglicanos (Klinger, 2005).

## 1.16.-Tipos de inflamación

La inflamación no siempre tiene un origen como lo es en un proceso inflamatorio focalizado, que puede ser consecuencia de un edema, una lesión o un proceso infeccioso, cuya principal característica de este tipo de inflamación es la presencia de calor, rubor, tumefacción, dolor y en algunos casos pérdida de la función.

La inflamación sistémica se caracteriza por la elevación en los niveles circulantes de citocinas proinflamatorias; así como aumento en la infiltración de macrófagos en tejidos periféricos. Este escenario inflamatorio no induce lesión o pérdida de la funcionalidad en el tejido infiltrado, rasgo distintivo de un estado de inflamación sistémica de grado bajo (Hotasmilingil, 2006). La inflamación sistémica de grado bajo posee una estrecha relación con el desarrollo de enfermedades cardiometabólicas en el paciente con obesidad, por lo que este estado de alteración inmune también ha recibido el nombre de metainflamación (León *et al.*, 2015).

Dependiendo de la duración, también se clasifica en aguda y crónica. La inflamación aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos. La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo, y cuando es sistémica se caracteriza por presentar daño vascular (León *et al.*, 2015).

La inflamación causada por una lesión generalmente es de duración aguda o subaguda y se caracteriza por presentar infiltrado celular de neutrófilos, eosinófilos, células NK, linfocitos T y macrófagos, pero la corta duración de este proceso detiene el daño y estimula regeneración celular. Por otro lado la inflamación sistémica, es un estado de inflamación de bajo grado crónico, caracterizado por infiltración de macrófagos en tejido vascular, formación de ERO y circulación sistémica de citocinas proinflamatorias, que se ha asociado con las complicaciones vasculares que se presentan en dislipidemias, hipertensión arterial, DT2, y aterogénesis (Díaz

*et al.*, 2004; León *et al.* 2015). La respuesta inflamatoria esta regulado por factores del sistema inmune, de los cuáles se ven modificados por factores ambientales semejantes a los que se presentan al activar la respuesta al estrés (Chrousos, 2009).

### **1.17.-Sistema Inmune**

El sistema inmune tiene dos componentes intercomunicados: la inmunidad innata o inespecífica e inmunidad adquirida o específica con dos componentes complementarios: humoral (efectuada por células B secretoras de anticuerpos) y celular (por linfocitos T CD4+ y CD8+) (Hawiger, 2001). Las células del sistema inespecífico son principalmente neutrófilos, macrófagos y células dendríticas; éstas inician y amplifican las respuestas inmunes fagocitando gérmenes y antígenos para presentarlos a los linfocitos T ayudadores (T CD4) del sistema inmune específico quién decide qué tipo de inmunidad específica o adquirida actuará, si la humoral o la celular (Klinger, 2005). La falta de sueño y el estrés se sabe que alteran preferencialmente la función inmune innata (Castanon, 2010).

La naturaleza del estresor utilizado determina la activación del sistema inmune, además órganos linfoides como la médula ósea, timo, bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas, se encuentran inervados por fibras posganglionares noradrenérgicas (Ader, 2007). Sin embargo, ésta no es la única vía de activación de la respuesta inmune. Las fibras simpáticas también interaccionan con otros órganos y células del sistema inmune, como los macrófagos, los linfocitos T (CD4+ y CD8+9), los granulocitos y las células asesinas naturales (NK) (Ader, 2007).

El estrés emocional agudo produce un incremento en la circulación de células en diferenciación que se diferencian hacia células NK, las cuales promueven la citotoxicidad dependiente de anticuerpos, lo que incrementa la circulación de células TCD8 en individuos sanos (Atanackovic, 2006), además de tener un efecto significativo sobre la función de los macrófagos (Gouin, 2011). Por otro lado, el

estrés crónico también resulta en la disminución de la actividad citotóxica de NK y en la reducción de la respuesta de células NK a citocinas (Gouin, 2011).

Durante la respuesta de estrés, fibras sensoriales aferentes y neuronas simpáticas posganglionares del sistema nervioso periférico influyen en la respuesta inmunitaria de inflamación. Entre los principales mediadores de la respuesta neural e inmune se encuentran los neurotransmisores: péptido relacionado con el gen de calcitonina (CGRP), somatostatina (SOM), NPY, la adrenalina y la noradrenalina, los cuales impactan sobre el sistema inmune a través de la estimulación de la secreción de citocinas mediada por diferentes tipos de células T, como las Th1 y Th2 (Powell, 2009). La inflamación de bajo grado puede considerarse un mecanismo de inmunidad innata, en contraste con la reacción inmune adaptativa, que es específica para cada tipo de agente infeccioso (León *et al.*, 2015).

### ***1.18.-Respuesta del sistema inmunitario al estrés***

Un gran número de citocinas son inhibidas por los GCs, especialmente las citocinas proinflamatorias. Los GCs afectan preferencialmente a los linfocitos T de tipo Th1 y estimulan la apoptosis de eosinófilos, también inhiben la expresión de moléculas de adhesión y sus correspondientes receptores. Los efectos inmunológicos de los GCs son hasta cierto punto controversiales, sin embargo muestran un efecto dependiente de la cantidad y dependiente del tiempo de exposición; a altas dosis inducen apoptosis de células T sobre todo en el timo (Ashwell y Vacchio, 2000).

Las propiedades de los GCs como antiinflamatorios, antialérgicos, inmunosupresores y sobre las respuestas inmunitarias los hace agentes terapéuticos de numerosas enfermedades, como la artritis reumatoide. Sin embargo, el tratamiento crónico con glucocorticoides representa un factor de riesgo para otras enfermedades, como la enfermedad cardiovascular través de múltiples vías, lo que resulta en un equilibrio entre beneficio y daño (León *et al.*, 2015).

Los GCs inicialmente producen un aumento del número de glóbulos rojos circulantes, también una disminución de los linfocitos, eosinófilos, monocitos, y

basófilos circulantes y un aumento de los neutrófilos (Chrousos, 2009). Otro de los mecanismos a través de los cuales los GCs contribuyen en el desarrollo de sus efectos inmunosupresores son la interferencia en la interacción entre anticuerpo (IgG) y/o complemento con la célula blanco, ya que altera el receptor celular de superficie (Ader, 1995); inhiben la capacidad fagocitaria y la interferencia de las interacciones celulares entre linfocito-monocito-macrófago, impidiéndose la activación de los últimos (Chrousos, 2009).

En las células T, los GCs inhiben la expresión de genes que codifican moléculas de activación celular e inducen diferenciación de los linfocitos Th1 hacia Th2, al inhibir la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ . No sólo los GCs tienen un efecto sobre la actividad del sistema inmune, se ha visto que CRH a nivel local en nervios periféricos posee actividad proinflamatoria y vasodilatadora, estimulando las células cebadas o mastocitos para liberar histamina (Chrousos, 1995), que eleva los niveles intracelulares de AMPc e inhibe la producción de IL-12, TNF- $\alpha$  y IFN- $\gamma$ , e induce IL-10 (Trinchieri, 1995) durante la respuesta aguda. Las catecolaminas también desvían la respuesta inmune hacia Th2 elevando la producción de IL-10 y reduciendo IL-12 en células dendríticas, actuando sobre receptores  $\beta$ -adrenérgicos que están presentes en células Th1 y ausentes en Th2 (Berquist, 1998).

El estrés crónico puede asociarse con un estado de inflamación de bajo grado, retrasando la cicatrización, la respuesta a vacunas y el aumento a la susceptibilidad de enfermedades infecciosas (Glasser, 2005). Las catecolaminas tienen un efecto inductor de citocinas proinflamatorias, mientras que los GCs tienen un efecto contrario (Gu *et al.*, 2012). Sin embargo, se dice que a largo plazo se produce un tipo de resistencia a los glucocorticoides, en el que después de una exposición a niveles o dosis altas y prolongadas de GCs se pierde la eficacia antiinflamatoria favoreciendo la respuesta inflamatoria, como lo sugiere Gu y colaboradores (2012) y se ilustra en la figura 6.

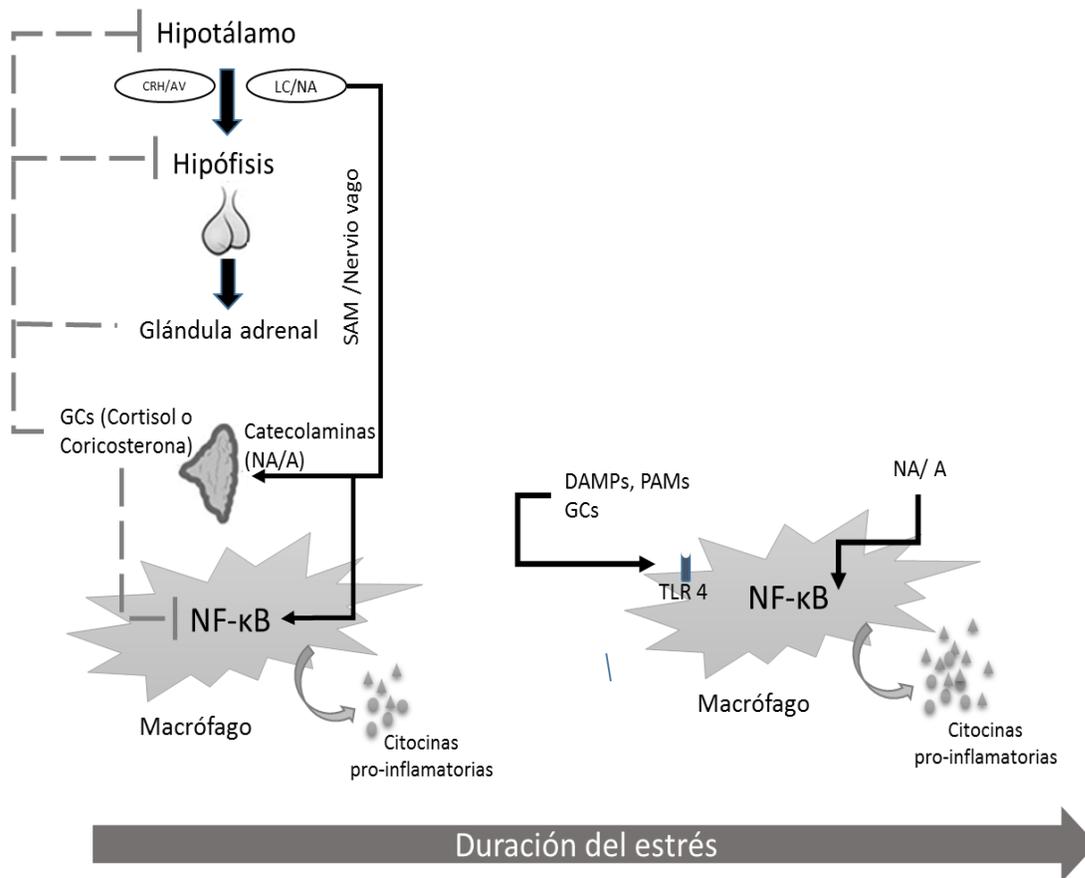


Figura 6. Representación de la interacción de la respuesta al estrés. Cuando el estrés es agudo, los glucocorticoides ejercen un papel anti-inflamatorio. Sin embargo, la circulación crónica de los GCs interactúa con la activación de otras vías de señalización en las que se encuentran involucrados los receptores tipo Toll (TLR4), los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), propuestos por Gu y colaboradores (2012).

Se ha relacionado el proceso inflamatorio con la respuesta al estrés debido a que existe evidencia de que pacientes con desorden depresivo tienen niveles elevados en sangre de citocinas pro-inflamatorias. Tadehus y colaboradores (2009) proponen que existe una interacción entre las citocinas y el receptor a GCs que impide la interacción del receptor con su elemento de respuesta, tanto in vitro como in vivo, lo que impide que se lleve a cabo una correcta regulación del eje HHA. Se ha sugerido que la circulación crónica de los GCs activa vías de señalización en las que se encuentran involucrados los receptores tipo Toll (TLR4), los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) y los patrones moleculares asociados

a daño (DAMs), propuestos por Gu y colaboradores (2012). Estos estudios apoyan la hipótesis de que el incremento de la respuesta del sistema inmune innato favorece la resistencia a GCs en la depresión mayor y en condiciones de estrés crónico (Nicolaidis, 2016) (Figura 6).

### **1.19.-Mecanismos de daño**

Cuando se habla de daño, generalmente se hace referencia a una lesión visible en cualquier zona del cuerpo, acompañada de un proceso infeccioso e inflamatorio. Sin embargo, el proceso de daño implica algo más que una lesión, ya que ahora se sabe que se puede producir daño a diferentes niveles celulares.

Los procesos de daño involucrados en hipótesis etiológicas acerca de las enfermedades crónico degenerativas incluyen alteraciones metabólicas encefálicas, resistencia central a la insulina, estrés oxidativo, excito-toxicidad, proceso inflamatorio, infecciones y tóxicos ambientales, entre otras (Sánchez, 2007). Las complicaciones que se presentan en algunas enfermedades crónico degenerativas, como la diabetes tipo 2, están asociadas a los mismos mecanismos de daño (Díaz *et al.*, 2004)

El daño por estos factores puede darse a diferentes estratos celulares, pero la acumulación de proteínas anormales y/o metabolismo alterado de las mismas repercute en procesos celulares vitales que conducen a la muerte celular selectiva probablemente mediada por apoptosis, como en la neurodegeneración (Sánchez, 2007).

La apoptosis o la muerte celular programada ocurre cuando a nivel celular el daño excede la capacidad de resistencia celular. En todo organismo adulto debe existir un equilibrio entre la proliferación y la muerte celular (Jodán, 2003), las alteraciones a este equilibrio trae como consecuencia cuestiones patológicas como cáncer, si la proliferación se encuentra aumentada, o las enfermedades crónicas degenerativas, cuando los procesos de muerte celular están incrementados y provocan una alteración en el funcionamiento del órgano.

Los procesos apoptóticos pueden ser activados bien por una inducción negativa (como la pérdida de una actividad supresora, la falta de factores de crecimiento o la disminución de los contactos con las células que la rodean) o por una inducción positiva como es el resultado de la unión de un ligando a un receptor o la recepción de señales conflictiva. Los receptores de muerte se caracterizan por presentar un dominio extracelular, rico en cisteína y un segundo dominio de localización citoplasmática conocido como el dominio de la muerte que es el responsable de la activación de la maquinaria apoptótica. Una vez activados, los receptores transfieren la información al interior celular mediante un sistema complejo de interacciones proteína-proteína que activan diversas cascadas intracelulares. Entre los segundos mensajeros que participan en los procesos de muerte celular más estudiados se encuentran el calcio y las especies reactivas del oxígeno, aunque recientemente están adquiriendo gran importancia otros como la ceramida y algunas proteínas tales como factores de transcripción (p53) y oncogenes (familia de bcl). La activación de estos segundos mensajeros suele conducir a la disfunción de las organelos citoplasmáticas, como la mitocondria, que libera citocromo c (Cit c), el retículo endoplásmico o la regulación de la actividad de complejos enzimáticos como cinasas y fosfatasas, que a su vez regulan la función de otras proteínas.

Entre las proteasas implicadas en la apoptosis se encuentran las caspasas, que se pueden clasificar en tres grupos: caspasas implicadas en la producción de citocinas: caspasas 1, 4, 5 y 13; caspasas de señalización o activación de otras caspasas: caspasas 2, 8,9 y 10. caspasas ejecutoras de apoptosis: caspasas 3, 6 y 7 (Juárez,*et al.*, 2015).

La apoptosis es esencial durante el desarrollo de los organismos y para el mantenimiento de la homeostasis en órganos y tejidos en el organismo adulto (Cascales, 2003). La apoptosis también se presenta como un instrumento de recambio tisular, por lo que bajo estas circunstancias la proliferación celular representa indicador del mantenimiento de órganos y tejidos.

De manera general se han descrito dos vías de señalización involucradas en la activación de la apoptosis: la vía extrínseca, la cual se inicia por la unión de un

ligando con su receptor, ubicado en la superficie de la membrana celular. Y la vía intrínseca, que se puede activar por cambios producidos en la integridad de la membrana mitocondrial (Blatt, 2001). En la activación de la apoptosis participan moléculas tanto antiapoptóticas como proapoptóticas, encargadas de regular las vías de señalización de la apoptosis, las cuales convergen en un componente en común, la activación de la caspasa 3, la principal caspasa efectora (Hengartner, 2000). La unión del ligando Fas (FasL) con el receptor Fas (vía extrínseca) ubicado en la membrana celular o el incremento en la relación Bax/Bcl-2 (vía intrínseca) en la membrana mitocondrial, inducen la activación de las caspasas 8 y 9, respectivamente; las cuales una vez activadas, rompen y activan a la caspasa 3.

Hiroya y colaboradores (2010) han sugerido la inducción de apoptosis en células del hipocampo, la cuál se asoció con las dificultades en el aprendizaje bajo condiciones de estrés crónico. Sin embargo, a nivel sistémico sólo se tiene evidencia de la inducción de vías apoptóticas en el aparato reproductor por efecto del estrés crónico (Juárez *et al.*, 2015).

## **2.-Antecedentes**

Aunque se ha demostrado la participación del estrés crónico en las alteraciones metabólicas de carbohidratos y lípidos, hacía falta evaluar lo que pasaba con dichas alteraciones cuando se aumentaba la exposición a condiciones estresantes. Con estresores que son repetitivos se ha visto una disminución de la respuesta al estrés después de 15 ó 20 días de tratamiento, situación que se interpretó como la señal de inicio de un proceso de habituación (Rostamankani, 2012). Se ha propuesto el modelo de estrés crónico leve impredecible (ECLI), en el cual, los animales son sometidos durante un periodo de tiempo prolongado a una serie de situaciones cambiantes con el fin de evitar la habituación y con el objetivo de asemejar situaciones cotidianas (Willner, 2005; Marin, 2006; Lucca *et al.*, 2009).

El ECLI se ha utilizado para estudiar aspectos relacionados con la depresión, a 21 días de exposición al modelo se ha encontrado una disminución de la ganancia de peso corporal (Jian, 2013), y se han encontrado que a 35 días de exposición hay

modificaciones en el metabolismo de glucosa en regiones cerebrales; además de aumentar la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-6 en hipocampo (Yazir, 2014) y en corteza cerebral (Jian, 2013). También se ha visto que a 40 días provoca aumento en lipoperoxidación en cerebelo y estriado (Lucca, 2009), además de provocar poca ganancia de peso corporal y una reducción en la ingesta de alimento. Por otro lado también se ha visto que ratas expuestas al estrés crónico impredecible expresan bajos niveles de leptina en plasma, y altos niveles de grelina (Brito, 2007). Estudios recientes muestran que exposición a ECLI por 28 días estimula expresión de grelina y su receptor, y disminuye la expresión de leptina y su receptor (Weina, 2015), los efectos del ECLI no se habían estudiado por más de 40 días.

En estudios previos que realizamos en el laboratorio se evaluó el efecto del ECLI sobre el metabolismo de carbohidratos y lípidos, para lo cual se determinaron los niveles de glucemias en la prueba de tolerancia a la glucosa, se midió el peso corporal y el consumo de alimento, así como los niveles de triglicéridos y colesterol. Los resultados mostraron alteraciones significativas en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (López et al., 2011).

La prueba de tolerancia a la glucosa mostró intolerancia a la glucosa a partir de los 40 días de inducción de estrés, agravándose a los 60 días, indicando una alteración metabólica importante (Figura 7A), que podría ser relacionada con la reducción en la ganancia del peso corporal (Figura 7B), que se manifiesta después de los 40 días de exposición al ECLI. Esta disminución fue atribuida a las alteraciones producidas durante la respuesta al estrés y su impacto sobre el metabolismo, demostrando además, que las alteraciones producidas se agravan si se mantiene la exposición al estresor, involucrando un desbalance metabólico a nivel corporal que se ve reflejado en la nula ganancia de peso, sin modificar la ingesta de alimento, comparando la ingesta con el grupo control (Figura 7C).

Por otro lado los niveles de colesterol y triglicéridos se vieron significativamente disminuidos a los 60 días de la inducción del estrés, sugiriendo también una alteración importante en el manejo de reservas corporales, que también podría estar

participando en la nula ganancia y pérdida de peso corporal (Figura 8), observada después de los 40 días de exposición al ECLI.

En estos estudios también se evaluó el efecto del ECLI durante 20 y 40 días sobre la actividad de SOD y CAT en diferentes órganos (hígado, páncreas e hipotálamo), observándose alterada la actividad de SOD en páncreas y en hipotálamo a los 40 días. La actividad enzimática de CAT se vio modificada en hipotálamo sólo a los 20 días. Además, en hígado se observó un incremento con respecto al control en la oxidación de proteínas, lo cual podría estar asociado con las alteraciones metabólicas observadas en el modelo. Sin embargo, aún hacía falta la evaluación de otros marcadores para identificar la presencia de estrés oxidante.

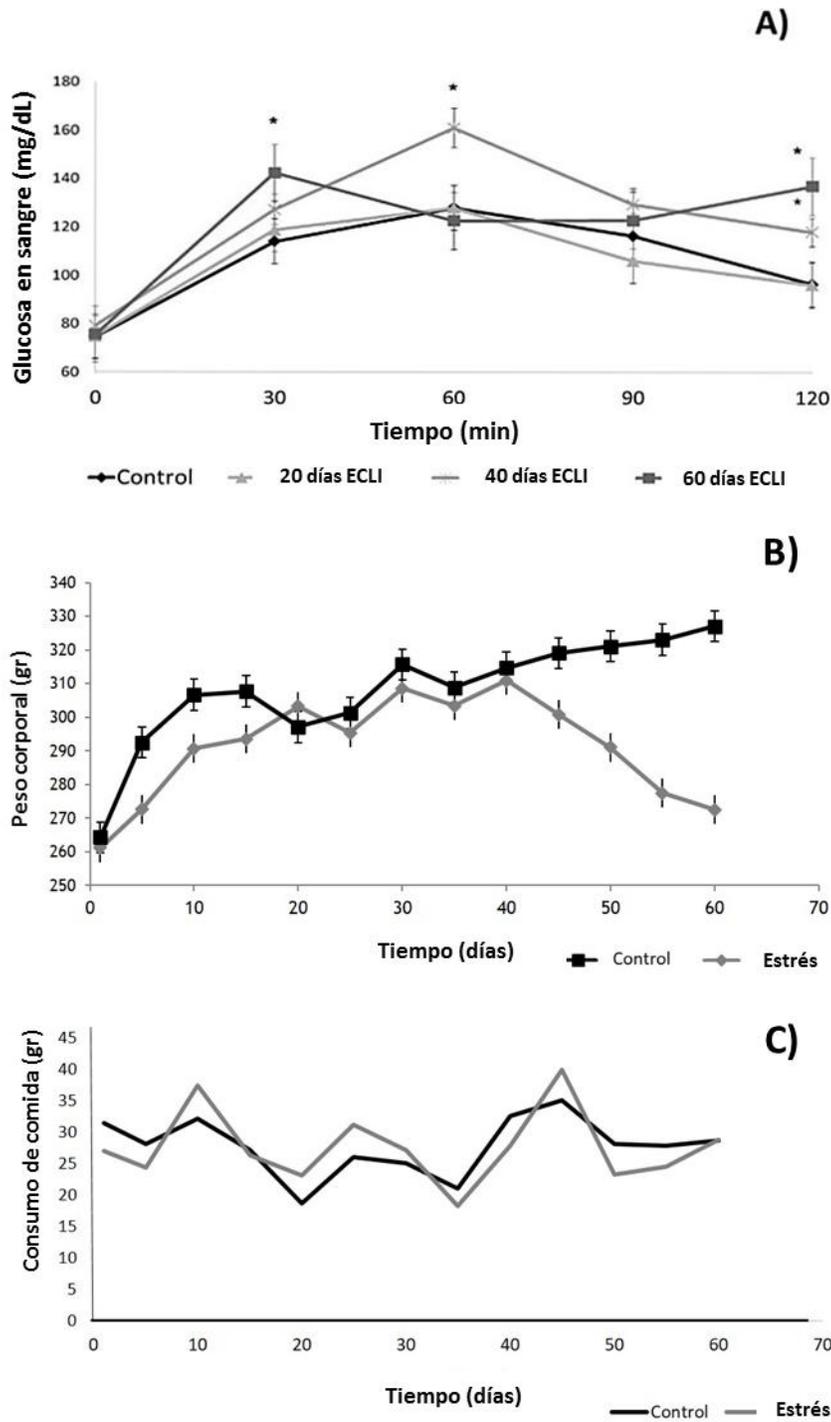


Figura 7. Efecto del estrés crónico en el metabolismo de carbohidratos (A), peso corporal (B) y consumo de alimento a los 20, 40 y 60 días de ECLI.

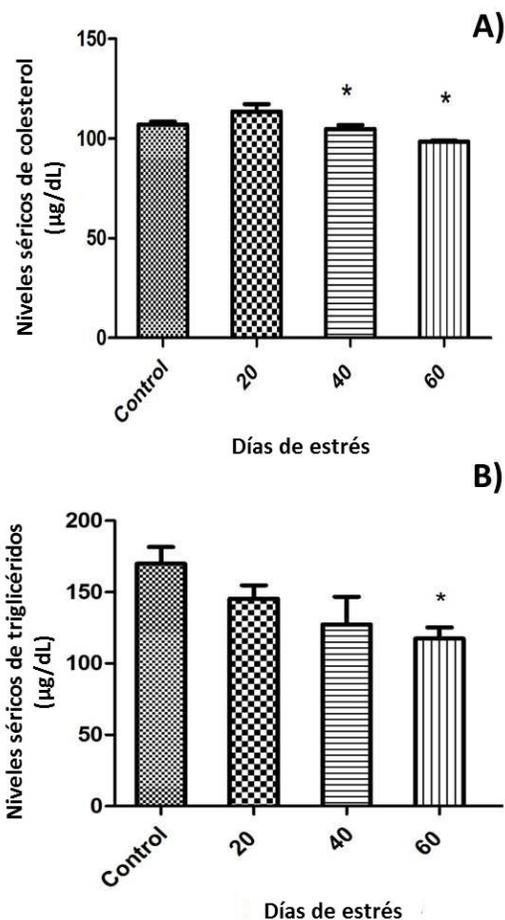


Figura 8. Efecto del estrés crónico en los niveles séricos de colesterol (A) y triglicéridos (B) en ratas sometidas a 20,40 y 60 días de estrés crónico leve impredecible.

Nuestros resultados también sugirieron el impacto del estrés en la actividad enzimática antioxidante, que pudo atribuirse a la intolerancia a la glucosa, debido a que la circulación constante de altas concentraciones de glucosa es un factor común en las complicaciones que se presentan por hiperglucemia crónica en pacientes con diabetes tipo 2 (Díaz *et al.*, 2004), obesidad y enfermedades cardiovasculares (Hotamisligil, 2006; Medzhitov, 2008). También se ha sugerido que mecanismos de daño como la inflamación y/o el estrés oxidante participan en las complicaciones que se presentan en la diabetes tipo 2 (Rostamankani, 2012).

Estas complicaciones también pueden ser causa/consecuencia de la resistencia a la insulina, donde el TNF- $\alpha$  también participa en la resistencia a la insulina,

inhibiendo la fosforilación del sustrato-receptor de insulina 1 (ISR-1); del cual se ha propuesto que las alteraciones en el residuo de serina del ISR-1, evita que éste sea fosforilado correctamente por las cinasas, lo que también inhibe la acción de la insulina (Hotamisligil, 2006). El proceso de inflamación sistémica puede ser considerado como una manifestación del estrés fisiológico capaz de generar estrés oxidante, aunque las vías que generan los mediadores de la inflamación (como moléculas de adhesión e interleucinas) son también inducidos por el estrés oxidante (Medzhitov, 2008).

La determinación de marcadores de inflamación se propone como otro mecanismo de daño a través del cual se producen las disfunciones metabólicas. A pesar de que se ha evaluado el efecto del estrés en tejidos sistémicos, no se ha reportado los niveles de estrés oxidante en páncreas bajo condiciones de estrés crónico. Por otro lado la asociación de daño provocado por estrés no ha sido demostrada.

### ***3.-Justificación***

Se sabe que las complicaciones metabólicas provocadas en hiperglicemia crónica llegan a provocar daño tisular en diferentes órganos y tejidos, sin embargo los procesos que anteceden y favorece el desarrollo de algún daño provocado por el desorden metabólico no se han evaluado en órganos involucrados en la regulación del metabolismo, como son el hígado y el páncreas; especialmente el páncreas, del cual se desconoce el efecto del estrés crónico sobre la producción de especies reactivas y estrés oxidante. Además, se tiene evidencia de que las alteraciones metabólicas a consecuencia de la exposición crónica de diferentes tipos de estrés crónico no se restablecen, sino que se mantienen y se agravan al aumentar el tiempo de exposición al estrés. Sin embargo no se ha evaluado el efecto del estrés en el sistema que regula el apetito-saciedad (greлина-leptina, insulina), por lo que se desconoce la participación del sistema de regulación neuroendocrino, en las alteraciones metabólicas inducidas por estrés crónico.

Aunque muchos resultados apoyan la idea de que el estrés fisiológico es un agente causal de alteraciones metabólicas, no se ha evaluado el proceso de inflamación sistémica en las alteraciones metabólicas inducidas por estrés crónico.

Además, se ha propuesto que los GCs inducen apoptosis en células del hipocampo, y que este déficit se relaciona con las dificultades de aprendizaje que se presentan bajo condiciones de estrés crónico. Sin embargo, a nivel sistémico no se ha encontrado evidencia que relacione los efectos del estrés con los procesos apoptóticos que puedan presentarse en hígado y páncreas de sujetos sometidos a condiciones de estrés crónico.

Por lo tanto, en este trabajo de tesis plantea continuar con la determinación del efecto del estrés crónico en los procesos que causan y agravan el metabolismo de carbohidratos, con el fin de esclarecer la temporalidad en la cual el estrés comienza a causar alteraciones en el hígado y páncreas, ya que se aportará evidencia acerca de los procesos que puedan anteceder estados de enfermedades crónicas degenerativas como la DT2.

#### **4.-Planteamiento del problema**

¿Cómo afecta el estrés crónico mediadores del sistema que regula el apetito-saciedad, el estrés oxidante y el proceso inflamatorio en las alteraciones metabólicas asociadas a estrés crónico?

#### **5.-Hipótesis**

El estrés crónico leve impredecible induce daño y alteraciones metabólicas debido a la disfunción neuroendócrina de mediadores del sistema de apetito-saciedad, y a la generación de estrés oxidante e inflamación sistémica.

#### **6.-Objetivo general**

Determinar la participación del sistema de regulación neuroendocrino del apetito y saciedad, del estrés oxidante y la inflamación sistémica en las alteraciones metabólicas inducidas por estrés crónico.

##### **6.1.-Objetivos particulares**

- Determinar el efecto del estrés crónico en mediadores neuroendocrinos que regulan el apetito y la saciedad (leptina-grelina, insulina) en ratas sometidas a 20, 40 y 60 días de ECLI.
- Determinar el efecto del estrés crónico sobre marcadores de daño producido por especies reactivas de oxígeno en hígado y páncreas a 20, 40 y 60 días de exposición a ECLI.
- Evaluar el efecto del estrés crónico sobre niveles de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-10) durante distintos periodos de ECLI.
- Determinar daño por apoptosis en hígado y páncreas por efecto del estrés crónico.

## **7.-Material y método**

Se utilizaron 30 ratas Wistar de tres meses de edad, de 250- 300 g, obtenidos del Bioterio de la UAM-Iztapalapa, mantenidas con un ciclo luz/oscuridad de 12 horas (9 am - 9 pm) con agua y alimento *ad libitum*. Los animales se separaron en grupos de 5 animales por caja, considerando un grupo control para cada tiempo y el grupo de estrés crónico leve impredecible para 20, 40 y 60 días (n=5 en cada tiempo). Los animales fueron mantenidos en cajas de 50x30x20 cm (5 ratas por caja). La manipulación de los animales fue realizada conforme a la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, revisada en 2001. Debido a que no se encontraron diferencias significativas entre los diferentes grupos control, los resultados se presentan sólo con un grupo control (n=15).

### **7.1.-Inducción del estrés: Modelo de estrés crónico leve impredecible (ECLI)**

Los animales fueron separados en dos grupos y para la aplicación de estrés, las ratas fueron alojadas en un cuarto en el cual se controló el inicio y terminación de los estresores. El grupo control fue manipulado diariamente para descartar la manipulación como factor de incidencia. El grupo experimental de estrés fue sometido a 20, 40 y 60 días del modelo ECLI (Tabla 1), de acuerdo al protocolo modificado descrito por Willner (2005) (Marin y Cruz, 2006; Lucca *et al.*, 2009).

Los animales del grupo estrés fueron sometidos a diferentes estresores como: privación de comida (12-24 horas), privación de agua (12-24 horas), inmovilización (se colocaron a las ratas en tubos de policloruro de vinilo con perforaciones, los cuales fueron cerrados con malla metálica, 1-3 horas), inmovilización más frío 4°C (1.5-2.5 horas), inmersión en agua fría (se sumergió a la rata en una caja con agua a 15°C (15 minutos), luz continua (24 horas), aislamiento (24-72 horas), objeto extraño (se utilizaron pelotas de plástico de 10 cm de diámetro, 3-5 horas), inclinación de la caja (45° de inclinación, 5 horas), frío 4°C (3 horas), hacinamiento (15-20 individuos por caja, 8-24 horas), cama mojada (5-24 horas) y ruido (40dB, 3-5 horas).

Tabla 1. Protocolo de estrés crónico leve e impredecible

<b>Día</b>	<b>Estresor (tiempo)</b>	<b>Día</b>	<b>Estresor (tiempo)</b>
1	Privación de alimento (12 h)	31	Inmovilización (2 h)
2	Privación de agua (12 h)	32	Luz continua (24 h)
3	Luz continua (24 h)	33	Privación de alimento (12 h)
4	Hacinamiento (24 h)	34	Cama mojada (12 h)
5	Hacinamiento (24 h)	35	Aislamiento y objeto extraño (5 h)
6	Sin estresor	36	Inmersión en agua fría (15 min)
7	Inmersión en agua fría (15 min)	37	Privación de agua (24 h)
8	Inmovilización (1.5 h)	38	Inmovilización y frio (1.5h)
9	Aislamiento (24 h)	39	Sin estresor
10	Aislamiento (24 h)	40	Privación de alimento (12 h)
11	Privación de alimento (12 h)	41	Hacinamiento (24 h)
12	Inmovilización (2 h)	42	Luz continua (24 h)
13	Hacinamiento (24 h)	43	Sin estresor
14	Hacinamiento (24 h)	44	Ruido (3 h)
15	Luz continua (24 h)	45	Aislamiento (24 h)
16	Cama sucia (12 h)	46	Privación de agua (24 h)
17	Inmersión en agua fría (15 min)	47	Inmovilización y frio (2 h)
18	Inmovilización (1.5 h)	48	Objeto extraño y ruido (5 h)
19	Sin estresor	49	Caja inclinada 45° (5 h)
20	Privación de alimento (12 h)	50	Privación de alimento/Hacinamiento (24 h)
21	Luz continua (24 h)	51	Frio (3 h) y Luz continua (24 h)
22	Inmovilización (2 h)	52	Privación de agua (24 h)
23	Privación de agua (12 h)	53	Luz continua (24 h)
24	Aislamiento (24 h)	54	Hacinamiento (24 h) y ruido (5 h)
25	Aislamiento (24 h)	55	Inmovilización (2 h) y hacinamiento (24 h)
26	Caja inclinada 45° (5 h)	56	Aislamiento (24 h)
27	Frio (3 h)	57	Objeto extraño (5 h)
28	Privación de alimento (12 h)	58	Frio plus Inmovilización (2.5 h)
29	Inmersión en agua fría (15 min)	59	Ruido (5 h) e inmersión en agua fría (15 min)
30	Hacinamiento (24 h)	60	Sin estresor

Estos estresores fueron aplicados preferencialmente al inicio de la fase de luz, variando el estresor a lo largo de la semana, como se muestra en la Tabla 1, buscando evitar la habituación de los animales.

Para descartar los efectos del estrés agudo, los animales fueron sacrificados por decapitación 24 h después de la aplicación del último estresor. La sangre fue colectada y los órganos extraídos para procesar y analizar las muestras. El suero se obtuvo al centrifugar la sangre a 1500 x g por 15 min. El suero fue almacenado a -70 °C para el análisis de corticosterona, grelina, leptina, insulina y citocinas.

### **7.2.-Evaluación de hormonas leptina-grelina, insulina y corticosterona**

La determinación sérica de insulina, leptina, grelina y corticosterona fue realizada mediante ELISA: Merck Millipore (Billerica, Massachusetts EU) para leptina y grelina total; ALPCO inmunoensayo (Salem, EU) para insulina y corticosterona, en ambos casos utilizando los reactivos específicos para cada kit y siguiendo las indicaciones de cada proveedor. Las placas de ELISA fueron leídas con un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan GO) a la longitud de onda especificada por cada proveedor.

### **7.3.-Análisis de tejidos**

El hipotálamo, hígado y páncreas fueron removidos y lavados en solución salina a 4°C. Hígado y páncreas fueron (0.1 g) fueron cuidadosamente divididos en diferentes medios, en donde fueron homogenizados: 600 µL de buffer de fosfatos (0.067 M, pH 7.8) con una solución inhibidora de proteasas (Roche, Indianapolis, IN, USA) para la determinación de SOD, CAT, TAC y oxidación de proteínas; 600 µL de ácido sulfosalicílico para la determinación de GSH; 500 µL de H<sub>2</sub>O desionizada y esteril, para la determinación de LPO. Todas las muestras se almacenaron a -70°C para su utilización de acuerdo al estudio experimental.

#### **7.3.1.-Extracción y cuantificación de proteína**

La extracción de la proteína total se realizó al homogenizar el tejido utilizando 1 ml de buffer de lisis (buffer de fosfatos pH 7) y 80 µl de un stock inhibidor de proteasas Complete (Roche, Indianápolis, IN). El homogenado tisular fue resuspendido varias veces y se dejó reposar 5 minutos a 4°C.

Después fue centrifugado a 8000 x g durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante conteniendo la proteína celular fue colocado en pequeños volúmenes y almacenado a -70°C.

El contenido de proteína en las muestras se realizó por el método de Bradford (1976) con el reactivo BioRad. Se tomó una alícuota de 1 µl de las muestras y se le adicionó 0.5 ml del reactivo de Bradford (1:4) se incubaron durante 20 minutos 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.

### ***7.3.2.-Receptores a leptina (Ob-R) y receptor a grelina (GHS-R1)***

El análisis del receptor Ob-R y GHS-R1 se realizó mediante Western blot, el cual permite la detección de la proteína dentro de una muestra biológica mediante la utilización de un anticuerpo que reconoce y se une a un epítotope único de la proteína de interés (Towbin et al., 1979).

Las muestras de hipotálamo se homogenizaron con 250 µl de buffer de lisis [10 ml de M-PER Tissue Protein Extraction Reagent, Thermo Scientific; 1 pastilla de inhibidor de proteasas, Complete Mini; 100 µl de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 0.1 M y 100 µl de ditioneitol (DTT) 1 M] durante 15-20 segundos.

Posteriormente, se incubaron a 4°C durante 15 minutos y se centrifugaron (13000 x g a 4 °C durante 10 minutos). El sobrenadante se recuperó y se almacenó a -80 °C. Previo a la electroforesis, se tomó una alícuota de cada muestra para cuantificar la concentración de proteínas totales.

De la cuantificación de proteínas totales se tomaron 100 µg de cada muestra, en un volumen final de 20 µl con buffer de carga (Tris-HCl 0.5 M pH 6.8, 2-mercaptoetanol, SDS al 10%, azul de bromofenol 0.05%, glicerol y agua destilada).

Posteriormente las muestras fueron incubadas a 95 °C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas y se utilizó un marcador de peso molecular (Precision

Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards #1610375) para identificar el peso molecular de las proteínas. Las muestras fueron colocadas en geles de acrilamida-bisacrilamida (29:1, Sigma) al 12% en un amortiguador formado por Tris HCl 1.5M pH 8.8, SDS al 10%, persulfato de amonio 10% y 5 µl de TEMED. Después, los geles se colocaron en una cámara de electroforesis (mini-Protean II, Bio-Rad) con un amortiguador formado por Tris Base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 1%, pH 8.3 a 120 voltios durante 90 min. Transcurrido el tiempo el gel se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, GE Healthcare).

La transferencia se realizó utilizando el sistema Trans blot turbo (Bio-RAD) humedeciendo papel filtro con buffer de transferencia (Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol 20% v/v, pH 8.3) a un voltaje de 25 voltios a 4 °C durante 25 min. Después de la transferencia, la membrana se lavó durante 60 minutos a temperatura ambiente con solución de leche descremada al 5% en TBS-Tween 20 (NaCl 137 mM, Tris-HCl 20 mM, Tween 20 0.1%, pH 7.5). Transcurrido este tiempo, la membrana se lavó dos veces con TBS-Tween 20.

La membrana se colocó en una solución que contenía leche descremada al 2% y el anticuerpo primario a una dilución 1:500 del receptor OB-R (Sc-8391 Santa Cruz), 1:500 de GHS R1 (Sc-10359, Santa Cruz) y  $\beta$ -actina (dilución 1:3000). La incubación se realizó durante toda la noche en agitación ligera a 4 °C. La membrana se lavó tres veces durante 10 minutos con TBS-Tween 20 y se incubó con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa (Santa Cruz) a una dilución 1:10000 a temperatura ambiente durante 120 minutos en agitación suave. Se lavó la membrana dos veces durante 10 minutos con TBS-Tween 20 y una vez con TBS solo. Finalmente se utilizó 300 µl de luminol (SuperSignal West Pico) y 300 µl de peróxido (SuperSignal West Pico Stable). La identificación se realizó en un fotodocumentador (KODAK Gel Logic 1500 Imaging System) para observar la luminiscencia generada en la reacción de la peroxidasa indicando la presencia de la proteína.

### **7.3.3.-Glutathion (GSH)**

La determinación de GSH fue realizada usando un kit comercial Biovision TM glutathione colorimetric assay kit (BioViosion, Bioptics, Tucson, AZ, USA). Fracciones de 0.1 g de hígado y páncreas fueron homogenizadas en 600 µL de ácido sulfosalicílico y luego centrifugado a 8000 x g por 20 minutos a 4°C, para separar la fracción citoplasmática. El GSH reacciona con DTNB para producir 2-nitro-5-ácido tiobenzoico, que se observó con una coloración amarilla, cuya absorbancia fue leída a 412 nm con un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan GO). Los resultados fueron expresados en µg de GSH/mg de proteína.

### **7.3.4.-Lipoperoxidación (LPO)**

Los niveles de lipoperóxidos en tejido fueron determinados usando un kit comercial (Calbiochem®, Gibbstown, NJ, USA). Para la extracción de lipoperóxidos 0.1 g de hígado y páncreas fue homogenizado con vortex en 500 µL de agua desionizada y estéril con 500 µL del extracto R (provisto por el proveedor) y 1 mL de cloroformo deoxigenado. Se centrifugó a 1500 x g por 10 minutos a 0°C. La fracción del cloroformo con hidroperóxidos fue colectada, La lipoperoxidación produce hidroperóxidos, los cuales fueron medidos utilizando reacciones de reducción con iones hierro (ion ferroso). Los hidroperóxidos son inestables por lo que en presencia de iones ferrosos reaccionan para producir iones férricos, que se detectan utilizando ión tiocianato como cromógeno, observándose una coloración rojiza. La presencia de lipoperóxidos fue detectada a 500 nm. Los datos se presentan en nmol de LPO/mg de proteína.

### **7.3.5.-Superóxido dismutasa (SOD).**

De la fracción citosólica se tomaron alícuotas para las determinaciones enzimáticas de SOD y CAT. 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 fotoreducción de la riboflavina y oxígeno. En una serie de tubos se preparó la mezcla de reacción formada por 0.1 a 10 µg 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 de 60 x 15 x 20 cm, la cual contenía tres lámparas fluorescentes de 20 W por un período de 10 minutos. Pasado ese tiempo se agregaron 0.05 ml de riboflavina 0.12 mM y se incubó en la misma caja por 20 minutos; las muestras se leyeron a 560 nm. Se determinó el porcentaje de inhibición de la reducción 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:

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

### **7.3.6.-Catalasa (CAT)**

La actividad de la enzima catalasa se determinó por el método de Berr 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 0.005 M de buffer de fosfatos pH 7. Las muestras fueron leídas a una longitud de 240 nm a 25°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 minuto.

### **7.3.7.-Capacidad antioxidante total (TAC)**

La detección de los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos se midió usando el kit Total Antioxidant Capacity Assay (TAC) (BioViosion, Bioptics, Tucson, AZ, USA). De la fracción citoplasmática se tomaron 50  $\mu\text{L}$  y se le agregaron 25  $\mu\text{L}$  de protein mask (provisto por el proveedor) y 25  $\mu\text{L}$  de agua grado HPLC. La reducción de iones  $\text{Cu}^+$  fue medida mediante un espectrofotómetro a 570 nm. El kit se basa en la capacidad antioxidante de reducir  $\text{Cu}^{2+}$  en  $\text{Cu}^+$ , el cual es detectado por la formación de  $\text{Cu}^+$  y batocuproina, detectado a 570 nm.

Se utilizó una solución conocida de Trolox para estandarizar la concentración de antioxidantes. Los resultados se expresaron en nmol de TAC/mg de proteína.

### ***7.3.8.-Oxidación de proteínas mediante OxyBlot***

El estrés oxidante modifica las proteínas favoreciendo la formación de grupos carbonilos, lo que lo hace un indicador de daño celular a nivel de proteínas celulares. El nivel de oxidación de proteínas se realizó de acuerdo con el método descrito por Rice y colaboradores (2012), 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 10 µg de la proteína total, la cual fue derivatizada con dinitrofenil hidrazina siguiendo el protocolo del OxiBlot (Chemicon Internacional, Temecula, CA), un kit comercial el cual determina proteínas oxidadas. Las muestras fueron colocadas en geles de acrilamida-bisacrilamida siguiendo el protocolo del western blot. El anticuerpo primario que reconoce a la proteína derivatizada fue utilizado a una dilución 1:500 (Anti-DNP; Kit OxyBlot™) y el anticuerpo secundario acoplado a la peroxidasa (anti-conejo IgG; OxyBlot™) 1:10000 por 1.5 horas. Como sustrato del anticuerpo secundario se agregaron 300 µl de luminol (SuperSignal West Pico) y 300 µl de peróxido (SuperSignal West Pico Stable). La identificación se realizó en un fotodocumentador (KODAK Gel Logic 1500 Imaging System) para observar la luminiscencia generada en la reacción de la peroxidasa indicando la presencia de la proteína. Las imágenes se analizaron con el software Image J. Los resultados se expresan como niveles relativos de proteína oxidada.

### ***7.4.-Evaluación de Citocinas***

La determinación de citocinas se realizó mediante ELISA en suero previamente almacenado a -70°C, utilizando los reactivos especificados por cada proveedor para el ensayo en ratas: Preprotech (Rocky Hill, NJ, USA) para IL-1β e IL-6, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) para TNFα y ALPCO Diagnostics (Salem, NH, USA) para IL-10.

Las placas fueron leídas con un espectrofotómetro con prisma Thermo Scientific (Multiskan GO) a las longitudes de onda especificadas por cada proveedor.

### **7.5.-Determinación de daño**

La determinación de daño en hígado y páncreas se realizó mediante western blot, mediante la detección de pro-caspasa 3, caspasa 3 (Santa Cruz, CA. SC-271759), cit c (Santa Cruz, CA. SC-13560) y PCNA (Santa Cruz, CA. SC-56) utilizados a una dilución 1:500 y dilución 1:10000 del anticuerpo secundario. Como sustrato del anticuerpo secundario se agregaron 300  $\mu$ l de luminol (SuperSignal West Pico) y 300  $\mu$ l de peróxido (SuperSignal West Pico Stable). La identificación se realizó en un fotodocumentador (KODAK Gel Logic 1500 Imaging System) para observar la luminiscencia.

### **7.6.-Análisis Estadístico**

Los resultados se analizaron mediante el análisis de varianza (ANOVA) y Tukey-Kramer como prueba post hoc para la comparación de los grupos. Los valores se consideraron estadísticamente significativos utilizando un nivel de significancia del 95%. Para el análisis se utilizó el software NCSS 2007 (Kaysville, UT, USA).

## **8.-Resultados**

### **8.1.-Efecto del ECLI en los niveles de corticosterona**

La corticosterona fue considerada un marcador del efecto del modelo animal sobre la activación del eje HHA. El ECLI incrementó los niveles de corticosterona desde los 20 y hasta los 60 días de exposición a estrés crónico. [F(3,26)=8.7, p<0.05] (Tabla 2).

### **8.2.-Efecto del ECLI en los niveles de insulina, leptina y grelina**

La exposición a ECLI modificó los niveles de insulina, grelina y leptina. La insulina incrementó significativamente solo a los 20 días de estrés [F(3,26)=13.17, p<0.05] (Tabla 2).

Los niveles de leptina descendieron desde los 20 y hasta los 60 días de ECLI [F(3,26)=23.8, p<0.05], mientras que los niveles de grelina incrementaron después de los 40 días de ECLI; estos niveles fueron significativamente incrementados con respecto al grupo control [F(3,26)=3.95, p<0.05] (Tabla 2).

Tabla 2. Niveles séricos de corticosterona, insulina, grelina y leptina en ratas sometidas a 20, 40 y 60 días de ECLI. Cada valor representa la media ± E.E.M. Control: n=15; ECLI: n=5.

	<i>Corticosterona</i> (µg/dL)	<i>Insulina</i> (µg/dL)	<i>Grelina</i> (µg/dL)	<i>Leptina</i> (µg/dL)
<i>Control</i>	3.33±1.33	1.1951±0.2648	0.1612±0.069	32.76±2.07
<i>20 días ECLI</i>	8.76±1.41*	3.5215±0.3350*	0.3309±0.075	8.71±3.10*
<i>40 días ECLI</i>	9.04±1.51*	1.1034±0.2653	0.5027±0.075*	9.12±3.10*
<i>60 días ECLI</i>	8.11±1.33*	0.8550±0.3349	0.4017±0.075	11.19±3.10*

\*Diferencia significativa con respecto al grupo control (p<0.05.) ANOVA, Tukey-Kramer.

### **8.3.-Efecto del ECLI en el sistema neuroendocrino de apetito-saciedad**

En la figura 9, se presenta un gel representativo que muestra el efecto del estrés crónico en los receptores a leptina y grelina. Se observa que la exposición al ECLI modifica la presencia del receptor Ob-R y GHS-R1 entre los 40 y 60 días de estrés crónico, disminuyendo ambos receptores. Se observa que en el grupo control el receptor Ob-R esta expresado mientras que la presencia del receptor a GHS-R1 se disminuye, sin embargo con forme aumenta la exposición al ECLI ambos receptores disminuyen su expresión en hipotálamo.

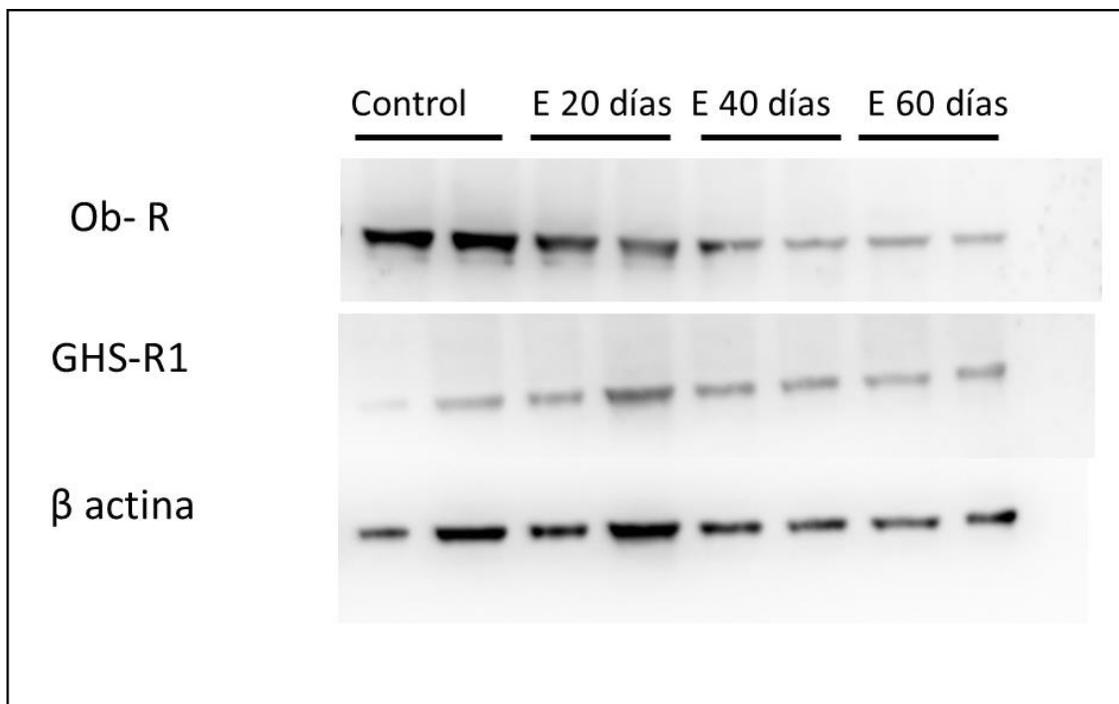


Figura 9. Efecto del ECLI en los niveles de receptores de hormonas reguladoras del apetito y la saciedad en hipotálamo de ratas sometidas a estrés crónico por 20, 40 y 60 días. Receptor a leptina (Ob-R), receptor a grelina (GHS R1).

#### **8.4.-Efecto del ECLI en los niveles de GSH**

Los niveles de GSH se muestran en la figura 10. En hígado la concentración de GSH incrementó sólo a los 20 días de ECLI [ $F(3,26)=6.473$ ,  $p<0.05$ ], sin observarse cambios significativos a los 40 y 60 días de estrés (Figura 10A). Por su parte, en páncreas se observó una reducción gradual de GSH a partir de los 40 días de tratamiento [ $F(3,26)=5.632$ ,  $p<0.05$ ] (Figura 10B).

#### **8.5.-Efecto del ECLI en los niveles de LPO**

Los niveles de LPO se muestran en la figura 11. La concentración de lipoperoxidos incremento significativamente en hígado a los 60 días de ECLI ( $F(3,26)=5.17$ ,  $p<0.05$ ) (Figura 11A), mientras que en páncreas incrementó significativamente a los 20 y 60 días de ECLI [ $F(3,26)=5.3$ ,  $p<0.05$ ] (Figura 11B).

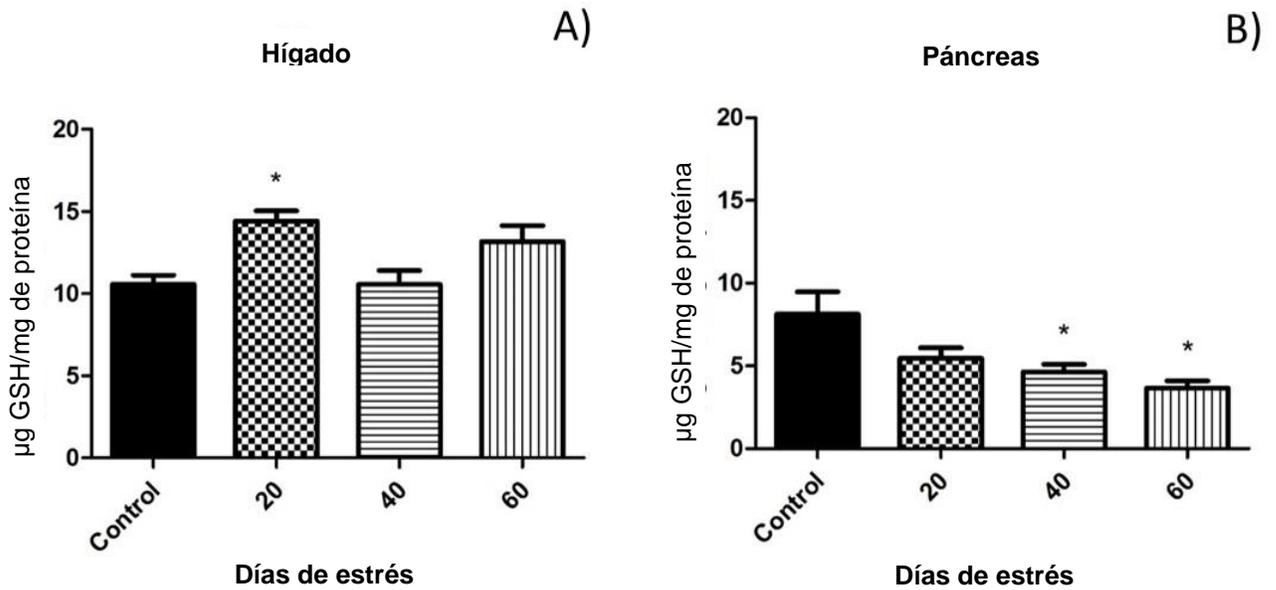


Figura 10. Efecto del ECLI en los niveles de GSH en hígado (A) y páncreas (B) de ratas sometidas a 20, 40 y 60 días de estrés crónico. Cada valor representa la media  $\pm$  E.E.M. Control: n=15; ECLI: n=5. ANOVA, Tukey-Kramer. \*Diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ).

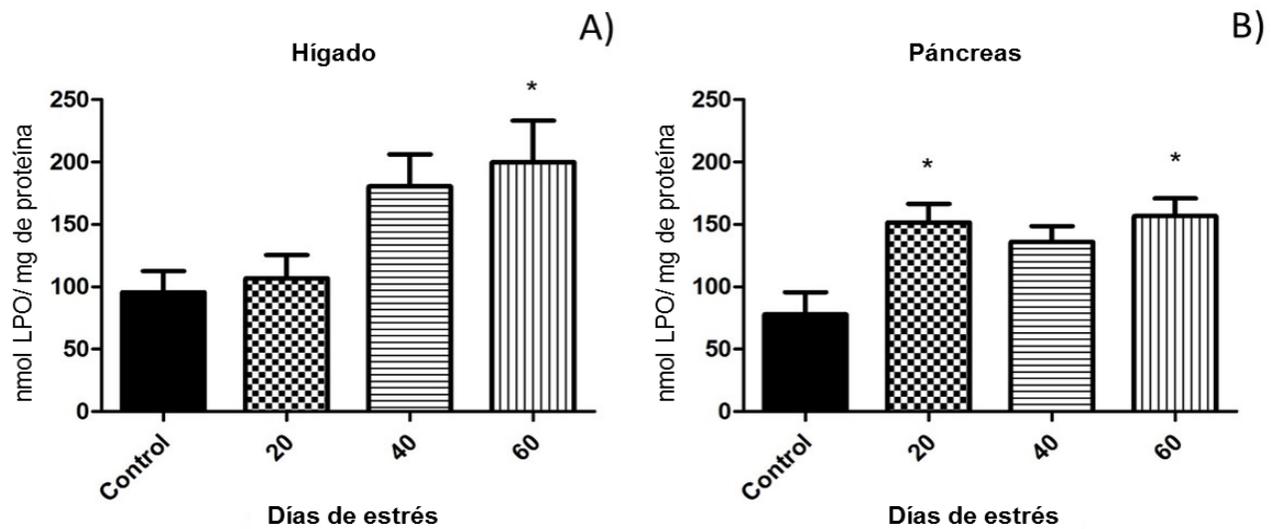


Figura 11. Efecto del ECLI en los niveles de LPO en hígado (A) y páncreas (B) de ratas sometidas a 20, 40 y 60 días de estrés crónico. Cada valor representa la media  $\pm$  E.E.M. Control: n=15; ECLI: n=5. ANOVA, Tukey-Kramer. \*Diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ).

### 8.6.-Efecto del ECLI en la actividad enzimática antioxidante (SOD y CAT)

La actividad enzimática de SOD y CAT, en hígado y páncreas, se muestra en la figura 12. En hígado la actividad de SOD no se modificó (Figura 12A), pero la actividad de CAT se redujo significativamente a los 20 días de estrés [ $F(3,26)=6.08$ ,  $p<0.05$ ] comparado con el grupo control (Figura 12C). En páncreas la actividad enzimática de SOD sólo incrementó significativamente a los 60 días de estrés (Figura 12B), mientras que la actividad de CAT no fue modificada (Figura 12D).

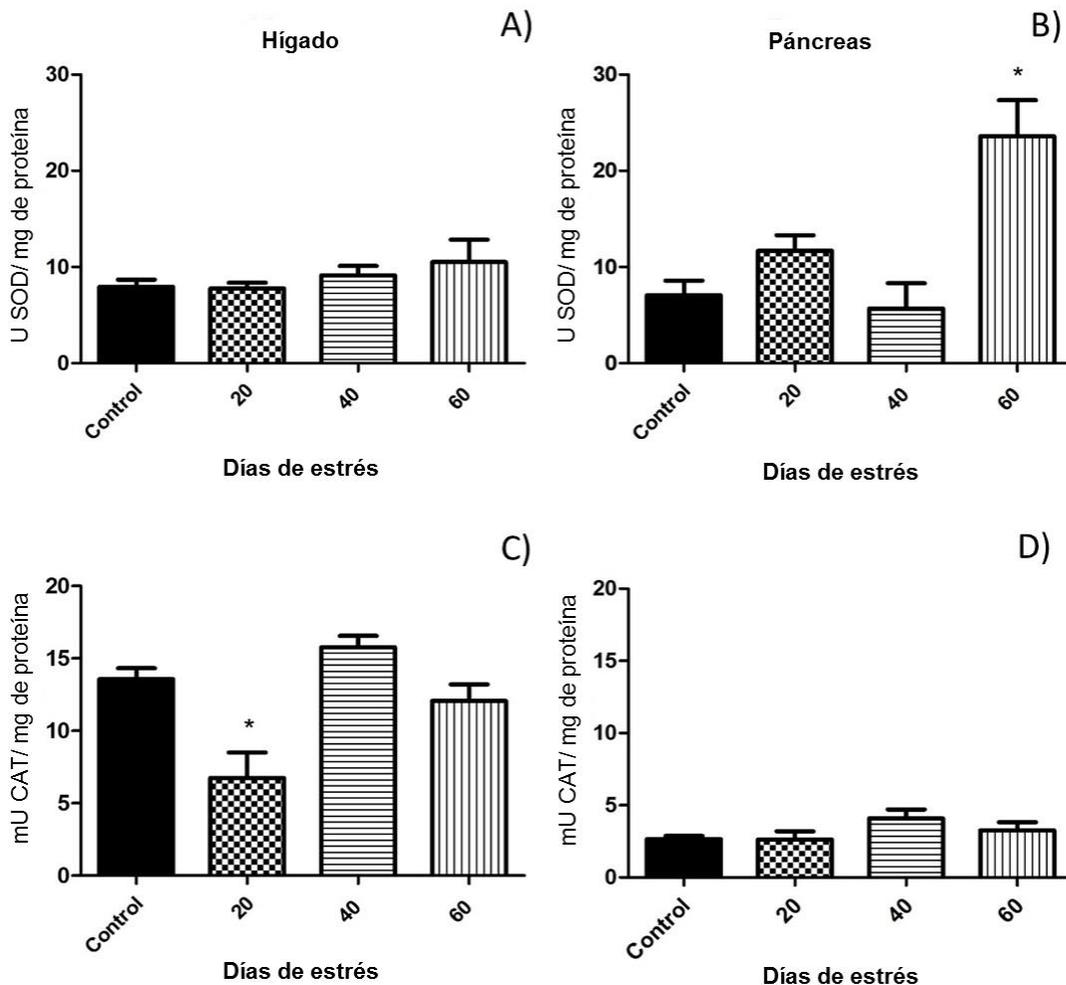


Figura 12. Efecto del ECLI en la actividad enzimática de SOD y CAT en hígado (A y C respectivamente) y páncreas (B y D respectivamente) de ratas sometidas a 20, 40 y 60 días de estrés crónico. Cada valor representa la media  $\pm$  E.E.M. Control:  $n=15$ ; ECLI:  $n=5$ . ANOVA, Tukey-Kramer. \*Diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p<0.05$ ).

### 8.7.-Efecto del ECLI en la TAC

ECLI no modificó la TAC en hígado (Figura 13A). En el páncreas se observó un decremento proporcional al tiempo de exposición al ECLI que es significativo después de los 40 días [ $F(3,26)=4.28$ ;  $p < 0.05$ ], comparado con el grupo control (Figura 13B).

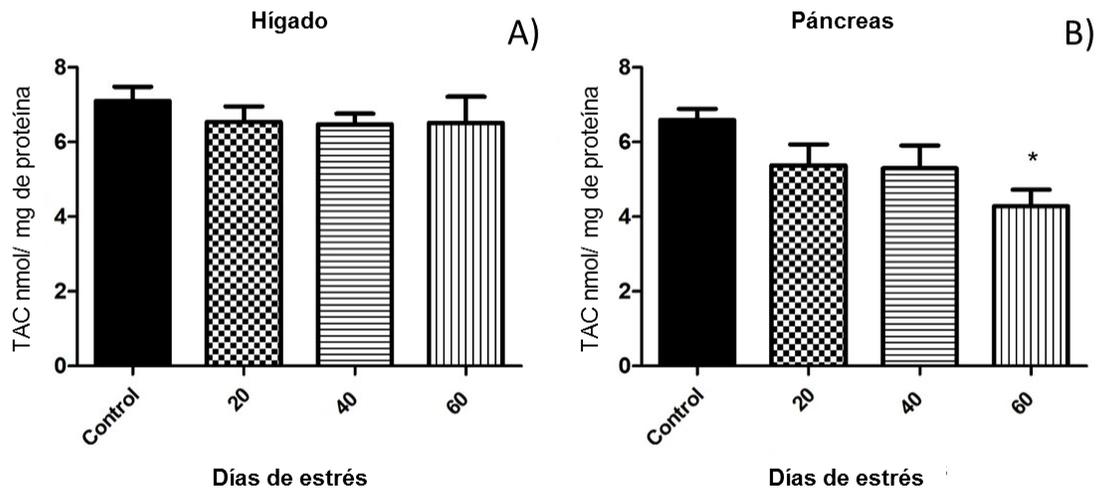


Figura 13. Efecto del ECLI en los niveles de TAC en hígado (A) y páncreas (B) de ratas sometidas a 20, 40 y 60 días de estrés crónico. Cada valor representa la media  $\pm$  E.E.M. Control:  $n=15$ ; ECLI:  $n=5$ . ANOVA, Tukey-Kramer. \*Diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ).

### 8.8.-Efecto del ECLI en la oxidación de proteínas

En la figura 6 se muestran los resultados de la oxidación de proteínas después del tratamiento con ECLI. Se puede ver un incremento progresivo en la oxidación de proteínas en hígado [ $F(3,26)=22.9$ ;  $p < 0.05$ ] y páncreas [ $F(3,26)=54.68$ ;  $p < 0.05$ ] a partir de los 40 y hasta los 60 días de estrés (Figura 146A y 14B). Se presenta un gel representativo que muestra la progresión en el incremento de oxidación de proteínas en ambos tejidos.

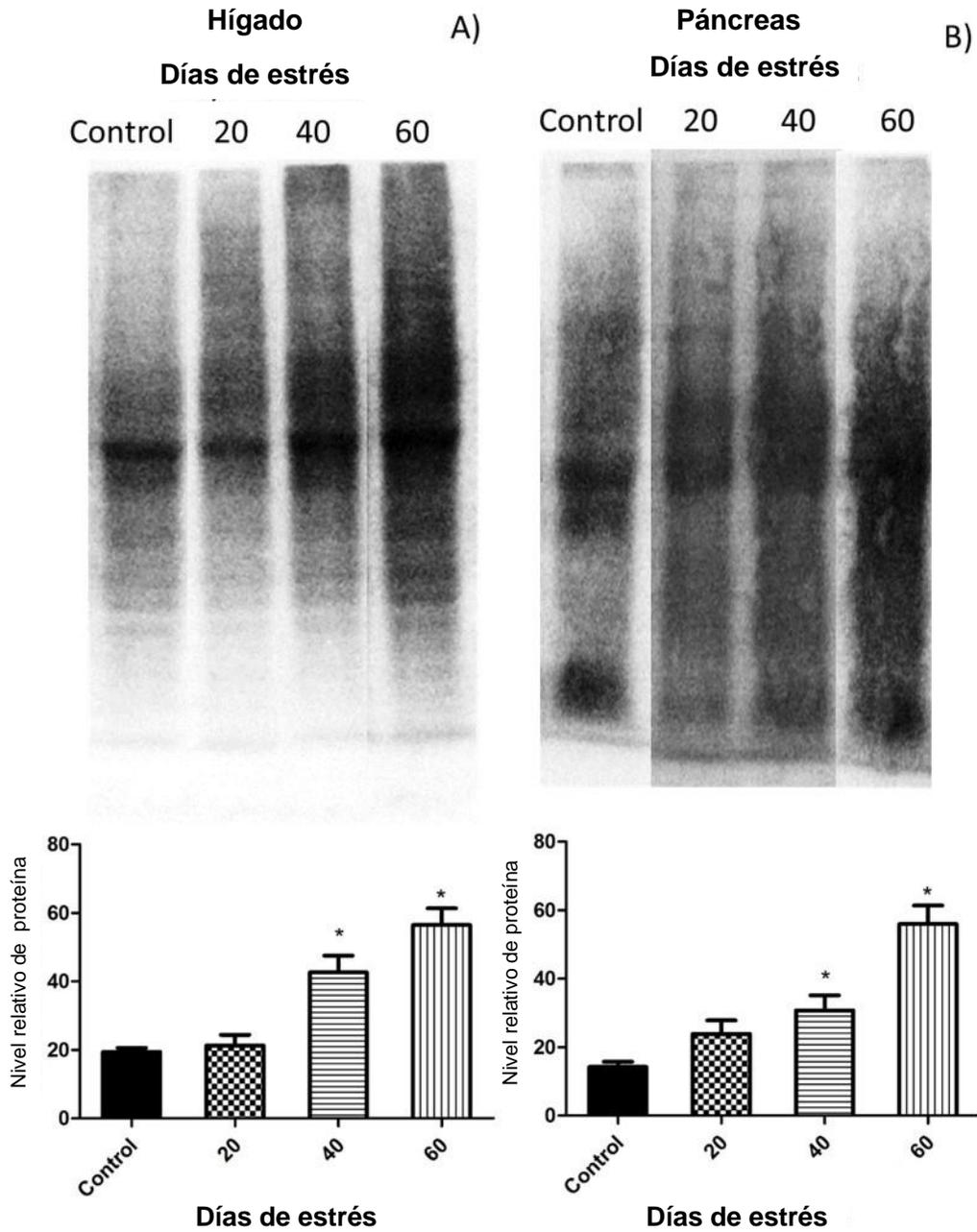


Figura 14. Efecto del ECLI en la oxidación de proteínas en hígado (A) y páncreas (B) de ratas sometidas a 20, 40 y 60 días de estrés crónico. Cada valor representa la media  $\pm$  E.E.M. Control: n=15; ECLI: n=5. ANOVA, Tukey-Kramer. \*Diferencia significativa comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ).

### 8.9.-Efecto del ECLI en el perfil inflamatorio

El efecto del ECLI en el perfil inflamatorio sistémico se presenta en la figura 15. ECLI incrementa los niveles séricos de IL-1 $\beta$  [F(3,21)=3.7; p<0.05] a los 60 días de tratamiento comprado con el grupo control (Figura 15A). TNF- $\alpha$  se incrementó significativamente [F(3,21)=11.24; p<0.05] a los 20 días (184.55  $\pm$  1.75 vs 5 301.42  $\pm$  8.18 pg/ $\mu$ l) (Figura 15B). Por otro lado los niveles séricos de IL-6 incrementaron a los 20 y 60 días de estrés [F(3,21)=7.06 p<0.05] (Figura 15C).

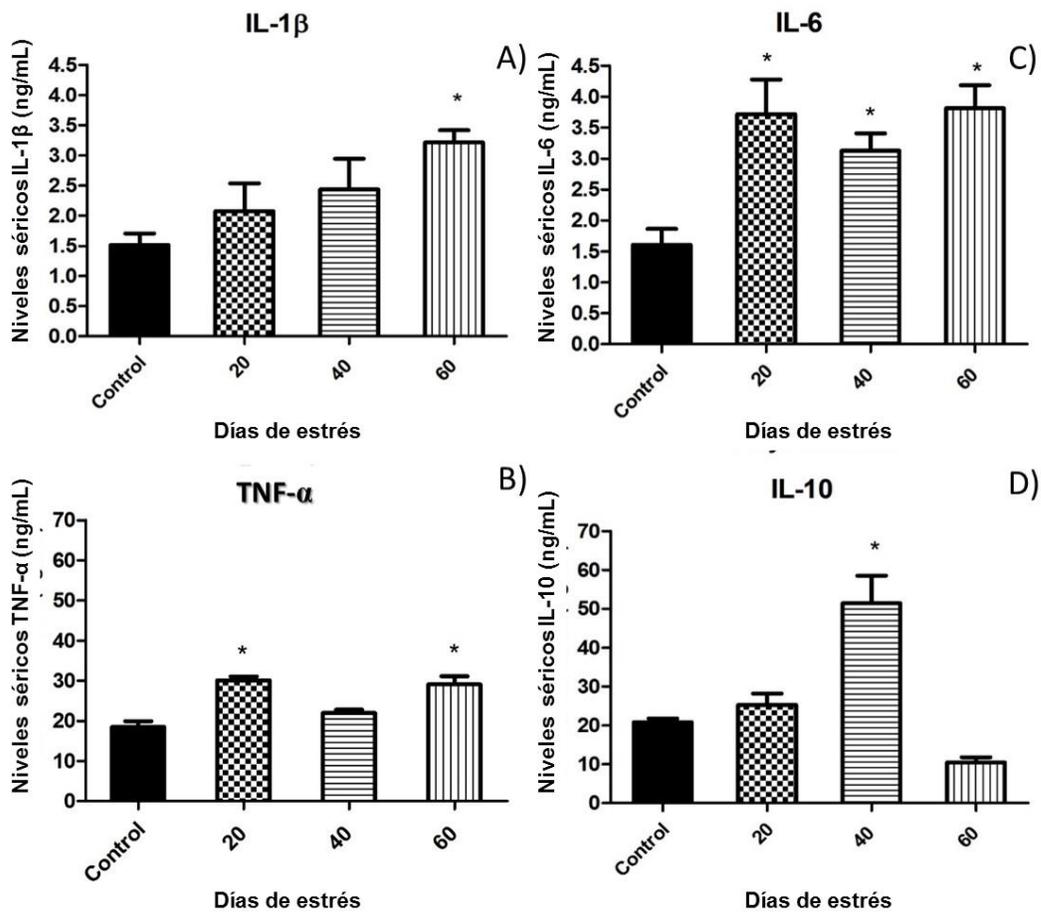


Figura 15. Efecto del ECLI en los niveles séricos de citocinas de ratas sometidas a 20, 40 y 60 días de estrés crónico. IL 1- $\beta$ (A), IL-16 (B), TNF- $\alpha$  (C) e IL-10 (D). Cada valor representa la media  $\pm$  E.E. M. Control: n=15; ECLI: n=5. ANOVA, Tukey-Kramer. \*Diferencia significativa comparada con el grupo control (p<0.05).

La citocina anti-inflamatoria IL-10 incrementó significativamente sólo a los 40 días de estrés ( $51.43 \pm 5.43$  ng/mL), aunque a los 60 días disminuye ( $10.46 \pm 1.148$  ng/mL), en comparación con el grupo control ( $20.83 \pm 0.92$  ng/mL) ( $F(3,13)=12.78$   $p<0.05$ ) (Figura 15D).

### 8.10.-Efecto del ECLI en los marcadores de daño y apoptosis

El efecto del estrés crónico sobre inductores de apoptosis: procaspasa 3, caspasa 3 y cit c se muestra en la figura 16. Se observa un aumento en los niveles de procaspasa 3 en ambos tejidos desde los 20 días de exposición al ECLI, por otro lado los niveles de caspasa 3 solo se manifiestan en hígado, preferentemente a los 40 días de estrés crónico, mientras que el citocromo c aumenta en páncreas desde los 20 y hasta los 60 días de tratamiento. Por otro lado el marcador de proliferación celular es proporcional a la expresión de caspasa 3 en hígado. Se presenta un gel representativo que muestra la progresión en el incremento de marcadores apoptoticos en ambos tejidos.

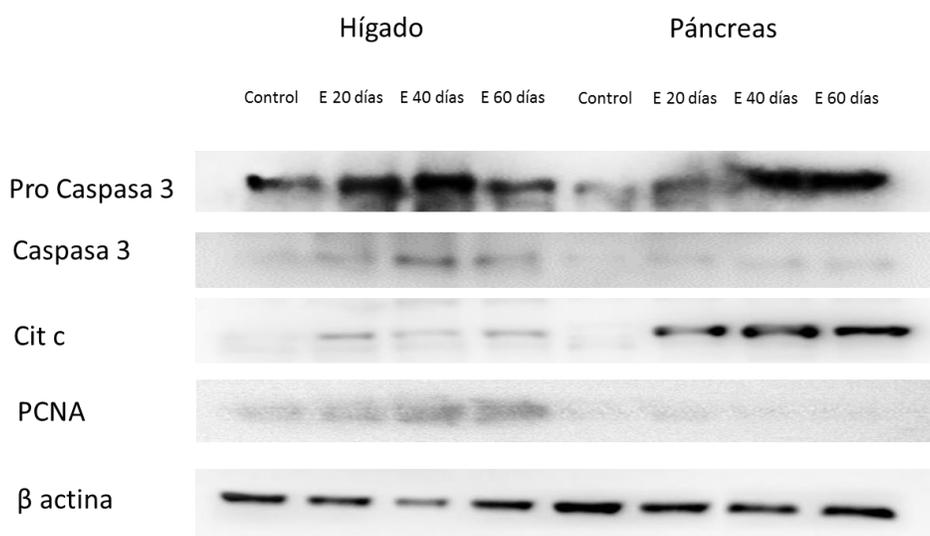


Figura 16. Efecto del ECLI en los marcadores de apoptosis celular: pro caspasa 3, caspasa 3 y citocromo c, en hígado y páncreas de animales sometidos a 20, 40 y 60 días de ECLI,  $\beta$  actina es considerada proteína constitutiva y control de carga para cada western blot.

## **9.-Discusión**

Los animales expuestos a ECLI por 60 días mantuvieron niveles elevados de corticosterona durante los 60 días de exposición al estrés. En nuestros resultados se observan alteraciones en los niveles de hormonas que participan en la regulación del apetito-saciedad, así como un aumento en los niveles de estrés oxidante en hígado y páncreas, que son órganos involucrados en la regulación metabólica sistémica. Así mismo encontramos un aumento en citocinas proinflamatorias hacia los 60 días de exposición al ECLI. Por lo que en este trabajo se aporta evidencias de los mecanismos de daño que involucran el estrés oxidante e inflamación sistémica, y que a su vez pueden estar propiciando la progresión de alteraciones metabólicas que involucran al sistema de regulación neuroendocrino del apetito-saciedad.

La secreción basal de corticosterona en roedores y cortisol en humanos se encuentra regulada por un ritmo circadiano (Mazzocoli, 2011), donde el menor pico de secreción de corticosterona se presenta al inicio de la fase de luz y el mayor pico de secreción se observa al inicio de la fase de oscuridad (Retana *et al.*, 2003). Entre los estresores que modifican los niveles de corticosterona esta la inmovilización (Gumuslu y Sahin, 2007), el frío, la inmersión en agua fría (Retana *et al.*, 2003) y los choques eléctricos (Koolhaas *et al.*, 2011; Marin *et al.*, 2006), que también se han evaluado de manera crónica a 20 días. Sin embargo, se ha visto que la exposición crónica hacia un mismo estresor induce una disminución en la respuesta al estrés hasta por 40 días (Marin, 2006; Gumuslu 2007; Teague, 2007), observando una reducción en la intensidad de la respuesta a través de tiempo debido a que el estresor es repetitivo y suele causar habituación en los animales.

Los resultados en el modelo de estrés crónico leve impredecible manifiesta un efecto sobre la activación del eje hipotálamo hipófisis adrenal, con la consiguiente liberación de corticosterona desde los 20 y hasta los 60 días de estrés crónico, dado que las concentraciones de corticosterona fueron significativamente más altas en los grupos sometidos a estrés, hormona considerada como un marcador de la respuesta al estrés.

Nuestros resultados son similares a los obtenidos por Lucca y colaboradores (2009), quienes reportaron un incremento en los niveles de corticosterona en animales sometidos durante 40 días a ECLI. En el presente estudio, también se observó activación del eje HHA a partir de los 20 días y hasta los 60 días de inducción de estrés. Con el objetivo de evitar la disminución en la respuesta a estrés se eligió el modelo ECLI, en el cual los estresores se aplicaron al inicio de la fase de luz con la finalidad de asociar los cambios con la respuesta al estrés y como un intento para evitar las variaciones circadianas. En estudios previos se encontró que el modelo de ECLI produce, mantiene y agrava las alteraciones en el metabolismo de lípidos y carbohidratos por efectos del estrés crónico, impactando en el peso corporal de los animales.

Pero los sistemas de regulación neuroendocrina de la ingesta de alimento no se habían evaluado bajo condiciones de estrés crónico. La sensación de hambre o saciedad resulta de una respuesta orquestada en la que se intercambian señales que vienen de la periferia (leptina, grelina e insulina) sobre las neuronas en el hipotálamo, así como aferencia de otras estructuras cerebrales que participan en tal proceso (Valassi *et al.*, 2008). Aunque los mecanismos que regulan las alteraciones metabólicas causadas por estrés no son bien conocidos se sugiere la participación de péptidos tales como la leptina y la grelina en trastornos emocionales causados por estrés como la depresión (Weina *et al.*, 2015).

Los animales sometidos a ECLI mostraron incremento en los niveles de insulina sólo a los 20 días, lo que posiblemente es un mecanismo de control del efecto de la respuesta al estrés en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Sin embargo, a los 40 y 60 días no se observaron cambios en este parámetro, lo que permite observar alteraciones importantes en manejo de carbohidratos y lípidos previamente reportado (López *et al.*, 2011). Este resultado puede interpretarse como un efecto compensatorio en la secreción de insulina cuyo propósito es mantener normales los niveles de glucosa; sin embargo, después de 40 días los niveles de insulina descienden y esto permite desarrollar la intolerancia a la glucosa que se desarrolla entre los 40 y 60 días de ECLI, pero no resistencia a la insulina.

Los resultados mostraron incrementos tanto en el pico hiperglucémico como en los niveles de grelina a los 40 días de exposición al ECLI, sin embargo, la ingesta de alimento no se modificó. El incremento en los niveles de grelina se relaciona con estados de balance energético negativo como el ayuno o la anorexia nerviosa, y están disminuidos en estados positivos como la obesidad (Cintra, 2007), por lo que el aumento de grelina podría haber favorecido la pérdida de peso hacia los 40 días de tratamiento. La reducción del peso corporal también puede atribuirse a los efectos metabólicos que ejercen los glucocorticoides en el organismo.

Aunque el efecto de los glucocorticoides sigue siendo algo controversial se ha reportado que la administración de cortisol provoca un decremento de la masa corporal (Cintra, 2007), que puede ser una consecuencia de la respuesta metabólica. El incremento en los niveles de grelina a los 40 días de estrés crónico podría reflejar un intento para compensar los efectos de la respuesta metabólica producida por la respuesta al estrés, que al volverse crónica podría poner en riesgo la sobrevivencia de los organismos, como lo proponen Zhao y Wortley (2010; 2013). La leptina también se le ha conferido participación en el peso corporal, al respecto se ha observado que bajo condiciones de estrés crónico y la disminución en los niveles de leptina se relaciona con la disminución del peso corporal (Maniam, 2012). En otros estudios se encontró un incremento en los niveles de grelina en respuesta al estrés inducido por restricción calórica (Lutter *et al.*, 2008; Perello y Zigman, 2012; Wortley *et al.*, 2013; Uchida *et al.* 2013).

Los niveles de leptina disminuyeron desde los 20 días, mientras que los niveles de grelina incrementaron a los 40 días de estrés. Desde esta perspectiva, nuestros resultados corroboran dicha correlación. Por otro lado en la literatura se menciona la participación de la leptina en la regulación de la respuesta del eje HHA.

Diversos estudios muestran que el aumento circulante de leptina reduce la respuesta al estrés en diferentes niveles del eje HHA (Malendowicz *et al.*, 2007; Mohame *et al.*, 2014), sin embargo, en este trabajo observamos una disminución de los niveles de leptina desde los 20 días de estrés, que además de exacerbar la

respuesta al estrés, están influyendo en la regulación de la ingesta de alimento y por lo tanto en el metabolismo de carbohidratos y lípidos.

La presencia de los receptores de leptina y grelina se encuentra modificada entre los 40 y 60 días de ECLI, lo que sugiere su participación neuroendocrina en las alteraciones metabólicas provocadas por estrés crónico. Se ha reportado que el aumento circulante de leptina y grelina se acompaña del aumento de su receptor (Weina, 2015). En el grupo control se observa que los niveles elevados de leptina, se acompaña del aumento en su receptor, como se describe en la literatura, sin embargo bajo condiciones de estrés crónico, encontramos que la exposición a ECLI disminuye la presencia del leptina y Ob-R a los 20 días de tratamiento, y se incrementa la presencia de GHS-R1 sólo a los 20 días, sin embargo a los 40 y 60 días de estrés ambos receptores disminuyeron, a pesar de que los niveles de grelina aumentaron. Por lo que se sugiere evaluar otros mediadores del apetito y saciedad como el NPY, AgrP, MCH o CART a nivel central, debido a que en resultados previos encontramos que la ingesta de alimento no se modifica (López *et al.*, 2011).

El restablecimiento de la homeostasis o el mantenimiento de la alostasis involucra una complicada regulación en la producción hormonal, neuroquímica y de moléculas oxidantes, como las especies reactivas de oxígeno, que se producen principalmente en el metabolismo celular; el desequilibrio y la sobreinteracción de estos sistemas favorece la generación radicales libres, lo que podría favorecer la producción de estrés oxidante. El estrés oxidante es considerado un mecanismo de daño tisular y participa en varias condiciones patológicas, incluidas la hipertensión, diabetes y la enfermedad hepática crónica, la circulación de altos niveles de estrés oxidante alteran a su vez otros órganos como el corazón, páncreas, hígado y pulmón (Ogura y Shimosawa, 2014).

El GSH representa uno de los más importantes antioxidantes no enzimáticos, debido a su amplia distribución celular y cuyo mecanismo es restablecer los mecanismos enzimáticos, además de detener las reacciones en cadena causadas por radicales libres (Díaz *et al.*, 2004). El hígado es el principal productor de GSH, por lo que no se observa una modificación en los niveles de GSH, lo que sugiere

una actividad antioxidante eficiente, propia del órgano en cuestión. Por su parte, en páncreas se observa una disminución progresiva en los niveles de GSH que se hace significativo a partir de los 40 días y hasta los 60 días de estrés crónico, lo que sugiere que el páncreas al tener niveles de GSH limitados lo hace más susceptible a los cambios en el estado redox. Los resultados corroboran la función del hígado al producir GSH puesto que encontramos niveles más altos que en páncreas.

Entre los marcadores de daño tisular por estrés oxidante determinamos LPO y oxidación a proteínas. El daño a lípidos representa un marcador de gran relevancia debido a que la LPO afecta la estructura celular (Díaz *et al.*, 2004). En cuanto a los niveles de LPO, encontramos en hígado un aumento de los niveles de LPO a los 60 días de ECLI, mientras que en páncreas observamos un aumento en los niveles de LPO a los 20 y 40 días de estrés crónico. Y que información existe con estrés crónico

Otro marcador de estrés oxidante que fue considerado en este estudio, fue la oxidación de proteínas como un indicador de daño a nivel proteínico, que impacta sobre el funcionamiento celular. En nuestros resultados encontramos mayor oxidación de proteínas en hígado desde 20 y hasta 60 días de tratamiento, mientras que en páncreas se observa mayor oxidación de proteínas a 60 días; el aumento en la oxidación de proteínas, tanto en hígado como en páncreas, varía con respecto al tiempo, y puede ser una consecuencia de los mecanismos de resistencia al estrés, en los cuales se pretende contrarrestar el efecto causado por el estresor; sin embargo, a los 60 días se observa mayor oxidación de proteínas en ambos tejidos, siendo más evidente y progresivo en hígado, lo cual puede atribuirse a que la carga metabólica es regulada principalmente por este órgano. En páncreas no se aprecia diferencia entre los 20 y 40 días, aunque encontramos mayor oxidación de proteínas en ambos tejidos hacia los 60 días de tratamiento, sugiriendo que las alteraciones en el funcionamiento de ambos órganos son un reflejo en la progresión del desorden metabólico de carbohidratos y lípidos (Díaz *et al.*, 2004).

Las alteraciones metabólicas producidas por los glucocorticoides y las catecolaminas también ejercen su efecto sobre la función antioxidante y la

producción de especies reactivas. En modelos animales de estrés repetitivo, como la inmovilización, se encontró un aumento en la producción de radicales libres y la disminución de la actividad de enzimas antioxidante (Liu et al., 1994; Gumuslu y Sahin, 2002, 2007).

En nuestros resultados encontramos algunos cambios de actividad enzimática en hígado y páncreas. La actividad de SOD no se modificó en hígado pero la actividad de la CAT disminuyó significativamente a los 20 días de ECLI, aunque los niveles se restablecieron entre los 40 y 60 días de tratamiento. Al respecto se tiene reportado que la actividad de SOD y CAT aumenta bajo condiciones de estrés por inmovilización a 20 días en este órgano (Gumuslu y Sahin, 2007), esta respuesta puede variar por la intensidad, tipo, tiempo y duración de los estresores utilizados. 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 un aumento de la actividad enzimática de SOD a los 60 días, que sugiere que el estrés está modificando la actividad de antioxidante a través de los diferentes tiempos de exposición evaluados, encontrando que la actividad enzimática antioxidante de hígado y páncreas responden diferencialmente a lo largo del tiempo. 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.

El incremento en la producción de radicales libres está asociado con la disminución en la función antioxidante (Valcoa, 2007). Para evaluar de manera general la funcionalidad de los sistemas antioxidantes se determinó la TAC, que mide la eficiencia de sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos. Los resultados mostraron que la actividad antioxidante en hígado es mayor y más eficiente en comparación con el páncreas, debido a que se observa una actividad antioxidante constante durante todo el tratamiento. Sin embargo en páncreas se encontró una disminución progresiva en estos sistemas hacia los 60 días de estrés crónico.

Así mismo, la progresión en la oxidación de proteínas hacia los 60 días estrés crónico sugiere una mayor producción de EROs, en ambos tejidos, a pesar de que en hígado los sistemas de defensa antioxidante son más constantes y eficientes no son suficientes para contrarrestar la producción de especies reactivas que se están produciendo a consecuencia del desorden metabólico causado por estrés crónico y, por lo tanto, se observa daño a proteínas y lípidos de membrana en ese órgano. Por su parte, el páncreas es un órgano más susceptible, observándose disminución de su capacidad antioxidante que va ligada con un aumento en el daño a proteínas y LPO hacia los 60 días de estrés crónico.

Aunque el vínculo entre el estrés fisiológico, estrés oxidante y las vías de activación de la inflamación es poco conocido se ha sugerido que los receptores tipo Toll o TLRs pueden estar participando en esta interacción (Gill, 2010; Gu, 2012; Machado, 2016). Los TLRs activan rutas de señalización comunes que culminan con la translocación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, el cual es un punto clave en la cascada inflamatoria (Machado, 2016), ya que promueve el aumento de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$  (Barton, 2003).

El ECLI modifica los parámetros de citocinas desde los 20 días de estrés crónico, observándose incrementados TNF- $\alpha$  e IL-6; mientras que a los 40 días estos valores se muestran atenuados, esto puede ser debido al incremento de la citocina anti-inflamatoria IL-10. Aunque no hay evidencia de que IL-10 sea una citocina reguladora, observamos también una disminución en los niveles de IL-10 seguido del aumento de las citocinas proinflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, lo que puede considerarse un estado de inflamación de bajo grado hacia los 60 días de ECLI.

Cuando la liberación de mediadores excede las fronteras locales, se diseminan y distribuyen a través de la sangre, produciendo una activación celular generalizada de tipo endocrino que se corresponde con el cuadro clínico del síndrome de respuesta inflamatoria sistémica es un mecanismo de defensa que forma parte del proceso de reparación tisular (Casanova, 2006). Esta inflamación puede tener como agente causal la producción excesiva de especies reactivas que se ve descontrolada después de los 40 días de estrés crónico. Por otro lado, la activación

de NFκB estimula la activación de citocinas proinflamatorias contribuyendo a la producción de estrés oxidante (Nita, 2014) después de los 40 días de tratamiento, lo que a su vez favorece la inflamación de bajo grado hacia los 60 días de estrés crónico.

Otro aspecto de gran importancia es que el estrés oxidante puede proceder de dos condiciones: por deficiencias en los mecanismos antioxidantes o por un 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 (Valko, 2007; Covarrubias, 2008).

Dentro de los mediadores del proceso inflamatorio también encontramos a las EROs (OH·; HOO·; O<sup>-</sup> y los productos de la LPO). La producción de EROs activa vías proinflamatorias, mientras que a su vez la inflamación produce EROs. La producción excesiva de EROs puede resultar en la iniciación, desarrollo y complicaciones de numerosas enfermedades (enfermedad vascular, cáncer, enfermedad neurodegenerativas, diabetes, entre otras) (Jafari, 2014).

Estudios en modelos de estrés en roedores han mostrado que los cambios en moléculas mediadoras de la inflamación inducen cambios conductuales. Jian y colaboradores (2013) han reportado que a los 20 días de ECLI se produce un aumento en la expresión de TNF-α e IL-6 en corteza prefrontal e hipocampo de ratas. En este trabajo, el efecto conductual del ECLI en los animales se observó hasta los 60 días de tratamiento, resaltando que durante los últimos 20 días de inducción de estrés los animales experimentales mostraron agresividad, piloerección y resistencia a la manipulación. Sin embargo, no se encontraron heridas visibles que pudieran estar interfiriendo en el resultado del perfil inflamatorio.

Aunque se ha sugerido la participación de los glucocorticoides en la inducción de apoptosis en hipocampo (Hiroya, 2010), la activación del proceso apoptótico se ha demostrado en testículo utilizando la inmersión en agua fría (Juárez, 2015) y en corteza prefrontal (Bachis, 2008), utilizando el modelo de ECLI. La evaluación de marcadores de daño y de activación de apoptosis, como la pro caspasa 3, la

caspasa 3 y el cit c sugiere la presencia de inductores de daño a nivel de mitocondrias en páncreas más que en hígado. Los niveles de cit c, que es un marcador de daño proveniente de mitocondrias aumenta desde los 20 y hasta los 60 días más en páncreas que en hígado, sugiriendo un proceso de daño, sin embargo aunque los niveles de pro caspasa 3, que es el inductor de la caspasa 3, están elevados en ambos tejidos, la caspasa 3 solo se observa elevada en hígado entre los 40 y 60 días de tratamiento. Estos resultados sugieren que el estrés inducido por ECLI está activando las vías apoptóticas.

Por otro lado, en hígado se observa una mayor presencia de caspasa 3 conforme aumentan los días de exposición al ECLI, este incremento en la apoptosis se encuentra compensado con un aumento en la presencia del marcador de proliferación celular PCNA, que corrobora mayor capacidad de resistencia en hígado, puesto que los procesos de apoptosis y proliferación se encuentran compensados (Jordán, 2003). Mientras que en páncreas sólo se observa un aumento de la señalización de apoptosis sin modificación en el proceso de proliferación celular, sugiriendo la susceptibilidad del páncreas a los estragos provocados por las alteraciones metabólicas a consecuencia del estrés crónico.

En este trabajo se amplió el tiempo de exposición al estrés para determinar si las alteraciones causadas por el estrés continúan, se agravan o se restablecen. La respuesta obtenida a diferentes tiempos de exposición al ECLI sugiere una serie de procesos que puede compararse con el síndrome general de adaptación propuesto por Selye (1950), donde observamos una etapa de resistencia entre los 20 y 40 días de estrés crónico. Sin embargo, entre los 40 y 60 días se pierde la etapa de resistencia y se observa una etapa de agotamiento, donde la regulación antioxidante y anti-inflamatoria deja de ser eficiente y el estrés crónico comienza a causar estragos en el organismo, como se muestra en la figura 17. El curso temporal de las alteraciones producidas en el metabolismo progresan como consecuencia de las complicaciones provocadas por el aumento de estrés oxidante y la activación del proceso inflamatorio, observables hacia los 60 días de exposición al ECLI. El daño producido tanto en hígado como en páncreas favorece la progresión de las

alteraciones metabólicas causadas por estrés, que pueden ser comparables con los procesos patológicos implicados en el desarrollo de enfermedades crónicas degenerativas, como se muestra en la figura 18.

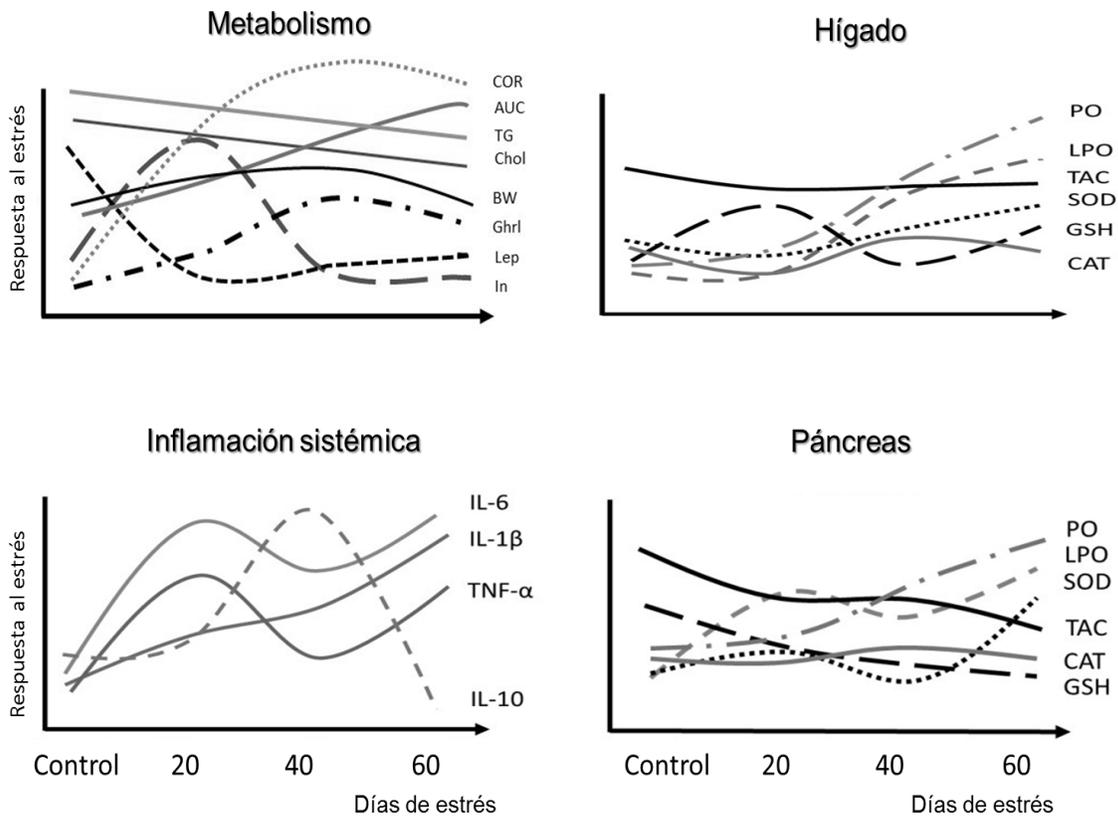


Figura 17. Efecto curso temporal de la respuesta fisiológica al estrés crónico en A) parámetros metabólicos: Corticosterona=COR, Área bajo la curva en tolerancia a la glucosa =ABC, Triglicéridos =TG, Colesterol= COL, Peso corporal=PC, Grelina =GRE, Leptina =LEP e Insulina= I; B) en la inflamación sistémica y en marcadores de estrés oxidante en C) Hígado y D) Páncreas de animales sometidos a diferentes tiempos de estrés crónico. Proteína oxidada=PO, Lipoperoxidación=LPO, Capacidad antioxidante total=TAC; Superoxido dismutasa=SOD; Catalasa=CAT y Glutati6n=GSH.

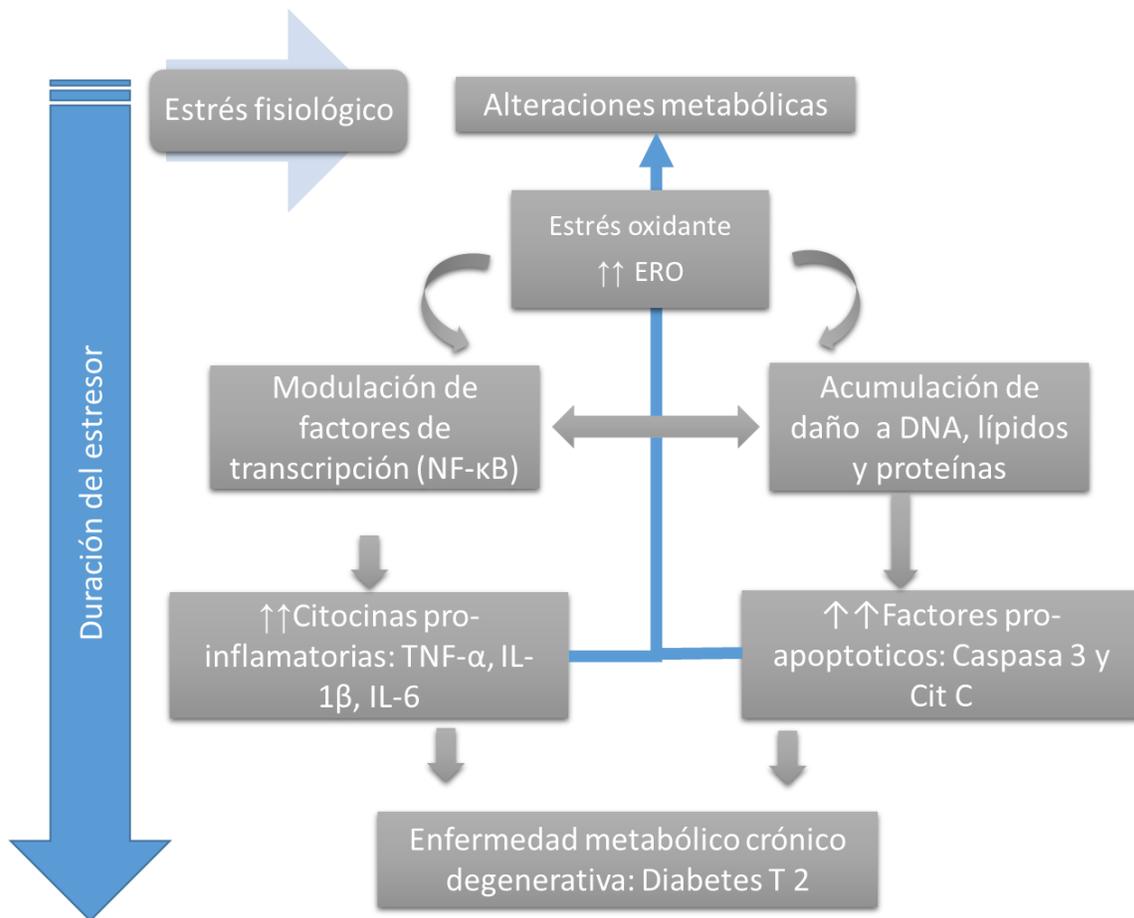


Figura 18. El estrés crónico no solo altera el metabolismo durante la respuesta al estrés, a nivel neuroendocrino la alteración de receptores involucrados en las conductas de apetito y saciedad participan en el aumento de las alteraciones metabólicas producidas por estrés crónico, favoreciendo el aumento de formación de especies reactivas, estrés oxidante e inflamación, que activan vías apoptóticas mediadas por caspasa 3, y que a su vez favorece la permanencia y progresión de las alteraciones metabólicas.

## **10.-Conclusiones**

1. Las alteraciones en los moduladores que regulan el apetito y la saciedad (leptina-grelina) podría favorecer que la respuesta metabólica provocada por estrés crónico se mantenga, progrese y se agrave.
2. El estrés crónico produce estrés oxidante en hígado y páncreas, siendo el páncreas un órgano más susceptible al daño por especies reactivas debido a que tiene capacidad antioxidante limitada.
3. El estrés crónico favorece la inflamación de bajo grado, que en conjunto con el estrés oxidante podrían promover el progreso de las alteraciones metabólicas observadas.
4. Este estudio contribuye a entender la progresión de alteraciones metabólicas causadas por estrés crónico. Estas alteraciones, sumadas a factores de riesgo, como la dieta, sedentarismo, genética y estilo de vida acelerado puede favorecer el desarrollo de enfermedades crónico degenerativas como la DT2.
5. 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 de los efectos deletéreos del estrés crónico.

## **11.-Perspectivas**

Evaluar el efecto del estrés sobre otros mediadores involucrados en el sistema apetito-saciedad, como la expresión de NPY, AgrP o CART.

Evaluar la expresión de factores de transcripción como Nrf2, involucrado en la respuesta antioxidante y NFκ-B, involucrado en la respuesta inflamatoria, debido a que ninguno se ha evaluado en la respuesta al estrés crónico en hígado y páncreas.

Evaluar la expresión de citocinas en tejido

Evaluar la participación de proteínas como FGF21, involucradas en la regulación metabólica y función hepática, bajo condiciones de estrés crónico.

Caracterizar el proceso apoptótico en tejido.

Debido a que el desarrollo de enfermedades como la diabetes son multifactoriales, probar el efecto del estrés más una condición como la dieta o la obesidad para determinar como es que la combinación de factores manifiesta los procesos de daño más anticipadamente, así mismo se puede probar un antioxidante o la importancia de los periodos de recuperación.

## 12.-Bibliografía

1. Adam T.C., Epel E.S. (2007). Stress, eating and the reward system. *Physiology & Behavior* 91;449–458.
2. Ader R. (2007). *Psychoneuroimmunology*, Elsevier Academic Press—4th Edition, 1-2, London. ISBN 978-0-12-088576-3.
3. American Psychological Association, 2016.
4. 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* 1;200-211.
5. Arora S., Anubhuti S. (2008), Leptin and its metabolic interactions – an update. *Diabetes, Obesity and Metabolism* 10: 973–993.
6. Ashwell J.D., Lu F.W.M., Vacchio M. (2000). Glucocorticoids in T cell development and function. *Annual Review of Immunology* 18;309-345.
7. Atanackovic D., Schnee B., Schuch G. (2006). Acute psychological stress alerts the adaptive immune response: stress-induced mobilization of effector T cells. *Journal of Neuroimmunology* 176;141–152.
8. Bachis A., Cruz M., Nosheny R., Mocchetti I. (2008). Chronic unpredictable stress promotes neuronal apoptosis in the cerebral cortex. *Neuroscience Letters* 442;104-108.
9. Barton G.M., Medzhitov R. (2003). Toll-like receptor signaling pathways. *Science* 2003;300:1524-1525.
10. Beck I.M., Van Crombruggen K., Holtappels G., Daubeuf F., Frossard N., Bachert C. (2015). Differential cytokine profiles upon comparing selective versus classic glucocorticoid receptor modulation in human peripheral blood mononuclear cells and inferior turbinate tissue. *PLoS One* 10:e0123068.
11. 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.

12. 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.
13. 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.
14. Brito Díaz B., Castro Fuentes R., Dominguez Coello S., Cabrera de León A. (2007). Psicoendocrinoneurología de la Obesidad. *Revista Española de Obesidad* 5:204-225.
15. Brown R.E. (1994). *Introduction to Endocrinology*. Cambridge University Press. 30-52; 88-107.
16. Busillo J.M., Cidlowski J.A. (2013). The five Rs of glucocorticoid action during inflammation: ready, reinforce, repress, resolve, and restore. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 24:109–119.
17. Cannon W.B. (1932). *The Wisdom of the Body*. W.W. Norton & Company, Inc., New York.
18. Casanova Egon R. (2006). Síndrome de respuesta inflamatoria sistémica. *Revista médica de Chile* 134(9),1200-1202.
19. Charmandari E., Tsigos C., Chrousos G. (2005). Endocrinology of the stress response. *Annual Review of Physiology* 67;259-284.
20. Chrousos, G.P. (2009). Stress and disorders of the stress system. *Nature Reviews Endocrinology* 5;374–381.
21. Cintra D.E., Ropelle E.R., Paul J.R. (2007). Regulación central de la ingestión alimentaria y el gasto energético: acciones moleculares de la insulina, la leptina y el ejercicio físico. *Reviews Neurology* 45;672-682.
22. Cosío B.G., Torrego A., Adcock I.M. (2005). Mecanismos moleculares de los glucocorticoides. *Archivos de Bronconeumología* 4;34-41.
23. Crispim C.A., Zalcman I., Dáttilo M., Padilha H.G., Edwards B., Waterhouse J., Tufik S., de Mello M.T. (2007). The influence of sleep and sleep loss upon food intake and metabolism. *Nutrition Research* 20;195-212.

24. Dallman, M.F. (2007). Modulation of stress responses: how we cope with excess glucocorticoids. *Experimental Neurobiology* 206;179–182.
25. De Kloet E.R., Joels M., Holsboer F. (2005). Stress and the brain: from adaptation to disease. *Nature Reviews Neuroscience* 6;463–475.
26. Díaz-Flores M., Baiza-Gutman L.A., Ibáñez-Hernández M.A., Pascoe-Lira D., Guzmán-Greenfel A.M., Kumate-Rodríguez J. (2004). Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica. *Gaceta médica de México* 140;437-447.
27. Diz-Chaves Y. (2011). Ghrelin, appetite regulation, and food reward: interaction with chronic stress. *International Journal of Peptides* 2011;898450.
28. Fink G. (2010). *Stress Science: Neuroendocrinology*, Academic Press, Elsevier UK.
29. Fruhbeck G., Salvador J. (2005). Regulation of food intake: a clinical perspective. *Endocrinology and Nutrition* 52;404-430.
30. Gill R., Tsung A., Billiar T. (2010). Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors. *Free Radical Biology and Medicine* 48;1121-1132.
31. González-Hita M. E., Ambrosio-Macías K.G., Sánchez-Enríquez S. (2006). Regulación neuroendocrina del hambre, la saciedad y mantenimiento del balance energético. *Investigación en Salud* 3;191-200.
32. Gouin J.P. (2011). Chronic stress, immune dysregulation and health. *American Journal of Lifestyle Medicine* 5;476–485.
33. Gu H.F., Tang C.K., Yang Y.Z. (2012). Psychological stress, immune response, and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 223;69-77.
34. Gümüşlü S.B., 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.
35. Gümüşlü S.B., Sahin E., Yargicoglu P., Agar A. (2002). Influences of different stress models on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat erythrocytes. *Free Radical Research* 36;1277–1282.

36. Gunnar M., Quevedo K. (2007). The neurobiology of stress and development. *Annual Reviews and Psychology* 58;145-173.
37. Hapgood J.P., Avenant C., Moliki J.M. (2016). Glucocorticoid-independent modulation of GR activity: Implications for immunotherapy. *Pharmacology and Therapeutics* 16:30092-30094.
38. Hawiger J. (2001). Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunology Research* 23:99-109.
39. Hiroya S., Takeyuki T., Kazumi S., Hirokatsu T., Siro U. (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.
40. Jafari M., Salehi M., Zardooz H., Fatemeh R. (2014). Response of liver antioxidant defense system to acute and chronic physical and psychological stresses in male rats. *Journal - Experimental and Clinical Sciences* 13;161-171.
41. Jiang H., Wang Z., Wang Y., Xie Y., Zhang Q., Luan Q., Chen W., Liu D. (2013). Antidepressant-like effects of curcumin in chronic mild stress of rats: Involvement of its anti-inflammatory Action. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 47;33–39.
42. 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.
43. Juárez-Rojas A.L., García-Lorenzana M., Aragón-Martínez A., Gómez-Quiroz L.E., Retana-Márquez Mdel S. (2015). Intrinsic and extrinsic apoptotic pathways are involved in rat testis by cold water immersion-induced acute and chronic stress. *Systems Biology in Reproductive Medicine* 61;211-21.
44. 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.

45. Konigsberg F. M. (2007). Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas, 1a ed., México: El Manual Moderno México.
46. 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-Levine G., Sgoifok A., Steimer O., Stiedl O., van Dijk G., Wöhr M., Fuchs E. (2011). Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 35;1291-1301.
47. 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.
48. Kyrou I., Tsigos C. (2009). Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism. *Current Opinion in Pharmacology* 9;787-793.
49. León
50. León Pedroza J.I., González Tapia L., del Olmo Gil E., Castellanos-Rodríguez D., Escobedo G., González-Chávez A. (2015). Low-grade systemic inflammation and the development of metabolic diseases: from the molecular evidence to the clinical practice. *Revista de Cirugía y cirujanos* 8: 543–55.
51. Liu W., Wang H., Wang Y., Li H., Ji L. (2015). Metabolic factors-triggered inflammatory response drives antidepressant effects of exercise in CUMS rats. *Psychiatry Research* 228;257-264.
52. Liu X. Wang, Mori A. (1994). Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione. *International Journal of Biochemistry* 26;511–517.
53. López López A. L.; Alarcón Aguilar F.J.; Bonilla Jaime H.; Escobar Villanueva M.C., Vázquez Palacios G. (2011). Efecto del estrés crónico sobre alteraciones metabólicas y su asociación con estrés oxidante. Tesis de Maestría. División Ciencias biológicas y de la Salud, Posgrado en Biología Experimental. México D.F.
54. Lu N.Z., Wardell S.E., Burnstein K.L., Defranco D., Fuller P.J., Giguere V., Hochberg R.B., McKay L., Renoir J.M., Weigel NL, Wilson EM, McDonnell

- D.P., Cidlowski J.A. (2006). International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors. *Pharmacological Reviews* 58:782-797.
55. Lu X.T., Zhao Y. X., Zhang Y., Jiang F. (2013). Psychological Stress, Vascular Inflammation, and Atherogenesis: Potential Roles of Circulating Cytokines. *The Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 62;1-6.
56. Lucas L.R., Wang C.J., McCall T.J., McEwen B.S. (2007). Effects of immobilization stress on neurochemical markers in the motivational system of the male rat. *Brain research* 1155;108-115.
57. Lucca G., 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.
58. Lucca G., Comim M.C., Valvassori S.S., Pereira J.G., Stertz L., Gavioli E.C., Kapczinsk F., Quevedo J. (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.
59. Lutter M., Sakata I., Osborne-Lawrence S., Rovinsky S.A., Anderson J.G., Jung S., Birnbaum S., Yanagisawa M., Elmquist J.K., Nestler E.J., Zigman J.M. (2008). The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress. *Nature Neuroscience* 11:752-753.
60. Machado X.A., Anunciato A.K., Rosenstock T.R., Glezer I. (2016). Gene Expression Control by Glucocorticoid Receptors during Innate Immune Responses. *Front Endocrinol (Lausanne)* 19;7-31.
61. Malendowicz L.K., Rucinski M., Belloni A.S., Ziolkowska A., Nussdorfer G.G. (2007). Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *International Review of Cytology* 263;63-102.
62. Maniam J., Morris M. (2012). The link between stress and feeding behaviour. *Neuropharmacology* 63;97-110.

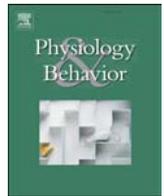
63. Marin M.T., Cruz F.C. (2006). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology and Behavior* 30:90(1);29-35.
64. Mazzocchi G., Carughi S., Sperandeo M., Paziienza V., Giuliani F., Tarquini R. (2011). Neuro-endocrine correlations of hypothalamic-pituitary-thyroid axis in healthy humans. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents* 25;249-57.
65. McEwen B., Goldstein D.S. (2002). Allostasis, homeostats and the nature of stress. *Stress* 5:55-58
66. McEwen B.S., Karatsoreos I.N. (2015). Sleep Deprivation and Circadian Disruption: Stress, Allostasis, and Allostatic Load. *Journal of Clinical Sleep Medicine* 10;1-10.
67. McEwen B.S., Wingfield J.C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior* 43;2–15.
68. Mohamed W.S., Hassanien M.A., Sayed Abokhosheim K.E.L. /2014). Role of ghrelin, leptin and insulin resistance in development of metabolic syndrome in obese patients. *Endocrinology and Metabolic Syndrome* 3;122.
69. Morilak D.A., Barrera G., Echeverria A.S., Hernández S. (2005). Role of brain in the behavioral response to stress. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 29;1214–1224.
70. Nicolaidis N., Lamprokostopoulou A., Sertedaki A., Charmandari E. (2016). Recent advances in the molecular mechanisms causing primary generalized glucocorticoid resistance. *Hormones (Athens)* 15:23-34.
71. Niswender K.D., Baskin D.G., Schwartz M.W. (2004) Insulin and its evolving partnership with leptin in the hypothalamic control of energy homeostasis. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15:362-369.
72. Nita M., Grzybowski A., Ascaso F.J., Huerva V. (2014). Age-Related Macular Degeneration in the Aspect of Chronic Low-Grade Inflammation (Pathophysiological Inflammation). *Mediators of Inflammation* 2014;1-10.
73. Perello M., Zigman J.M. (2012). The role of ghrelin in reward-based eating. *Biological Psychiatry* 72;347–353.

74. Powell N.D., Bailey M.T., Mays J.W. (2009). Repeated social defeat activates dendritic cells and enhances Toll-like receptor dependent cytokine secretion. *Brain, Behavior, and Immunity* 23;225–231.
75. Razzoli M., McCallum J., Gurney A., Engeland W.C., Bartolomucci A. (2015). Chronic stress aggravates glucose intolerance in leptin receptor-deficient (db/db) mice. *Genes and Nutrition* 10;8.
76. Regan L.P., Grillo C.A., Piroli G.G. (2008). The As and Ds of stress: Metabolic, morphological and behavioral consequences. *European Journal of Pharmacology* 585;64-75.
77. Retana-Márquez S., Bonilla-Jaime H., Vázquez-Palacios G., Martínez-García R., Velázquez-Moctezuma J. (2003). Changes in masculine sexual behavior, corticosterone and testosterone in response to acute and chronic stress in male rats. *Hormones and Behavior* 44;327-337.
78. Rice K.M., Meduru S., Kakarla S.K., Katta A., Mupparaju S.P., Kidd B., Goebel L.J., Blough E.R. (2012). Chronic paracetamol treatment influences indices of reactive oxygen species accumulation in the aging Fischer 344 X Brown Norway rat aorta. *Annals of Clinical & Laboratory* 42;152-161.
79. Rostamkhani F., Zardooz H., Zahedi A.S., Farrokhi B. (2012). Comparison of the effects of acute and chronic psychological stress on metabolic features in rats. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 13;904-912.
80. Salposky R.M., Romero M.L, Munck A.U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocrine Reviews* 21;55-89.
81. Selye H. (1936). Thymus and adrenals in response of the organism to injuries and intoxications. *British Journal of Experimental Pathology* 17;234–241.
82. Selye H. (1976). *The Stress of Life*. New York: McGrawHill.
83. Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal* 17; 1382-1392.
84. Sen C. K., Packer L. (1996) Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *The FASEB Journal* 10;709-720.

85. Stone A.A., Brownell K.D. (1994). The stress-eating paradox: multiple daily measurements in adult males and females. *Psychology and Health* 9:425–36.
86. 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.
87. Surwit R.S., van Tilburg M.A., Zucker N., McCaskill C.C., Parekh P., Feinglos M.N., Edwards C.L. (2002). Stress management improves long-term glycemic control in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 25;30-34.
88. Tanaka M., Yoshida M., Emoto H., Ishii H. (2000). Noradrenaline systems in the hypothalamus, amygdala and locus coeruleus are involved in the provocation of anxiety: basic studies. *European Journal of Pharmacology* 29:405;397-406.
89. Teague C.R., Dhabhar F.S., Barton R.H., Beckwith-Hall B., Powell J., Cobain M., Singer B., McEwen B.S., Lindon J.C., Nicholson J.K. (2007). Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in Sprague-Dawley rats. *Journal of Proteome Research* 6;2080–2093.
90. Thaddeus W.W., Miller P., Miller A. (2009). Cytokines and Glucocorticoid Receptor Signaling: Relevance to Major Depression. *The New York Academy of Sciences* 1179;86–105.
91. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76;4350-4354.
92. Uchida A., Zigman J.M., Perello M. (2013). Ghrelin and eating behavior: evidence and insights from genetically-modified mouse models. *Frontiers in Neuroscience* 7;121-131.
93. Valassi E., Scacchi M., Cavagnini F. (2008). Neuroendocrine control of food intake. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases* 18;158-168.

94. Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Croninc M.T.D., Mazura M., Telser J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Journal of Biochemistry and Cell Biology* 39;44–84.
95. Vazquez Frigolet M.A. (2006). Señalización de la leptina. *REB* 25(2);50-54.
96. Venkataraman S., Munoz R., Candido C., Witchel S.F. (2007). The hypothalamic pituitary adrenal axis in critical illness. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders* 8;365-373.
97. Verdile G., Keane K.N., Cruzat V.F., Medic S., Sabale M., Rowles J., Newsholme P. (2015). Inflammation and Oxidative Stress: The Molecular Connectivity between Insulin Resistance, Obesity, and Alzheimer's Disease. *Mediators of Inflammation* 2015;105828.
98. Weina L., Hongmei W., Yangkai W., Haipeng L., Liu J. (2015). Metabolic factors-triggered inflammatory response drives antidepressant effects of exercise in CUMS rats. *Psychiatry Research* 228;257–264.
99. Willner P. (2005). Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency 1 and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS. *Neuropsychobiology* 52;90-110.
100. Winterbourn C.C., Hawkins E.R., Brian M., Carrell R.W., (1975). The estimation of cell peroxidase dismutase activity. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 85;337-342.
101. Wortley K.E., Anderson K.D., Garcia K., Murray J.D., Malinova L., Liu R., Moncrieffe M., Thabet K., Cox H.J., Yancopoulos G.D., Wiegand S.J., Sleeman M.W. (2013). Genetic deletion of ghrelin does not decrease food intake but influences metabolic fuel preference. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101;8227–8232.
102. Yazir Y., Utkan T., Gacar N., Aricioglu F. (2015). Resveratrol exerts anti-inflammatory and neuroprotective effects to prevent memory deficits in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *Physiology and Behaviour* 138;297-304.

103. Yeager M.P., Guyre P.M., Munkc A.U. (2004). Glucocorticoid regulation of the inflammatory response to injure. *Acta Anaesthesiologica Scandinavica Foundation* 48;799-813.
104. You J.M., Yun S.J., Nam K.N., Kang C., Won R., Lee E. H. (2009). Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 87;440-447.
105. Zafir A., Banu N. (2009). Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats. *Indian Journal of Biochemistry and Biophysics* 46;53-58.
106. Zardooz H., Zahedi A.S., Gharib Naseri M.K., Hedayati M. (2006). Effect of chronic restraint stress on carbohydrate metabolism in rat. *Physiology and Behaviour* 89;373-378.
107. Zhao T.J., Sakata I., Li R.L., Liang G., Richardson J.A., Brown M.S., Goldstein J.L., Zigman J.M. (2010). Ghrelin secretion stimulated by 1 $\beta$ -adrenergic receptors in cultured ghrelinoma cells and in fasted mice. *Proceedings of the National Academy of Science* 107;15868–15873.



## Chronic unpredictable mild stress generates oxidative stress and systemic inflammation in rats



Ana Laura López-López<sup>a,\*</sup>, Herlinda Bonilla Jaime<sup>b</sup>, María del Carmen Escobar Villanueva<sup>c</sup>, Malinalli Brianza Padilla<sup>a</sup>, Gonzalo Vázquez Palacios<sup>d</sup>, Francisco Javier Alarcón Aguilar<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Posgrado en Biología Experimental Biological and Health Sciences Division (DCBS), Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa (UAMI), CP 09340, México, D.F., Mexico

<sup>b</sup> Behavioral and Reproductive Pharmacology Laboratory, DCBS, UAMI, CP 09340, México, D.F., Mexico

<sup>c</sup> Pharmacology Laboratory, DCBS, UAMI, CP 09340, Mexico, D.F., Mexico

<sup>d</sup> College of Science and Technology, Universidad Autónoma de la Ciudad de México-San Lorenzo Tezonco, CP 09790, México, D.F., Mexico

### HIGHLIGHTS

- Stress is risk factor for pathologies that are considered priority health problems.
- CUMS alter redox state in the liver and pancreas.
- CUMS producing low-grade systemic inflammation.
- Resistance period between 20 and 40 days of stress is surpassed at 60 days.

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 10 January 2015

Received in revised form 6 November 2015

Accepted 14 March 2016

Available online 7 April 2016

#### Keywords:

Chronic stress

CUMS

Inflammation

Oxidative stress

Liver

Pancreas

### ABSTRACT

Stress is considered to be a causal agent of chronic degenerative diseases, such as cardiovascular disease, diabetes mellitus, arthritis and Alzheimer's. Chronic glucocorticoid and catecholamine release into the circulation during the stress response has been suggested to activate damage mechanisms, which in the long term produce metabolic alterations associated with oxidative stress and inflammation. However, the consequences of stress in animal models for periods longer than 40 days have not been explored. The goal of this work was to determine whether chronic unpredictable mild stress (CUMS) produced alterations in the redox state and the inflammatory profile of rats after 20, 40, and 60 days. CUMS consisted of random exposure of the animals to different stressors. The following activities were measured in the liver and pancreas: reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total antioxidant capacity (TAC), and protein oxidation. Similarly, serum cytokine levels (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10) were determined. CUMS activated the stress response from day 20 until day 60. In the liver and pancreas, GSH levels were decreased from day 40, whereas protein lipid peroxidation and protein oxidation were increased. This is the first work to report that the pancreas redox state is subject to chronic stress conditions. The TAC was constant in the liver and reduced in the pancreas. An increase in the TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 inflammatory markers and a decrease in the IL-10 level due to CUMS was shown, thereby resulting in the generation of a systemic inflammation state after 60 days of treatment. Together, the CUMS consequences on day 60 suggest that both processes can contribute to the development of chronic degenerative diseases, such as cardiovascular disease and diabetes mellitus. CUMS is an animal model that in addition to avoiding habituation activates damage mechanisms such as oxidative stress and low-grade chronic inflammation, which allows the study of physio-pathological stress aspects over prolonged time periods of at least 60 days.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

### 1. Introduction

Stress has been associated with the development of chronic degenerative diseases, such as cardiovascular disease, rheumatoid arthritis, Alzheimer's, diabetes mellitus, and metabolic syndrome [1–4]. Although oxidative stress and inflammation have been implicated in the development of diverse pathologies due to chronic stress, the activation process of this system is not clear.

\* Corresponding authors at: Departamento Ciencias de la Salud, D.C.B.S., Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco No. 186 Colonia, Vicentina, Iztapalapa, 09340 México, Mexico.

E-mail addresses: [anaelep1@gmail.com](mailto:anaelep1@gmail.com) (A.L. López-López), [aaaf@xanum.uam.mx](mailto:aaaf@xanum.uam.mx) (F.J.A. Aguilar).

Animal models (mainly rats) have been utilized to study the physiopathological aspects related to stress. The most commonly used stressors are immobilization, cold, and cold-water immersion, which can be applied for different exposition times. The chronic unpredictable mild stress (CUMS) model is a stress model that is also used as a depression animal model [5]. In this model, the animals are randomly exposed to different stressors with the goal of diminishing the animals' habituation. To date, its behavioral effects have only been studied for up to day 40 [6].

The stress response induces the activation of the hypothalamic–pituitary–adrenal axis and increases glucocorticoids levels; corticosterone (the main glucocorticoid in rodents) is released from the adrenal cortex [7]. Homeostasis reestablishment or allostasis maintenance under stress conditions involves neuro-chemical and endocrine regulation that results in metabolic alterations [7,8]. In this sense, the liver and pancreas are regulators of metabolism and therefore their functions are also altered in the stress response.

Understanding the molecular and cellular pathways activated in the response to stress is very important for the development of pharmacological interventions for the prevention and treatment of diseases induced by physiological stress. One of the most important mechanisms of stress is the production of reactive oxygen species (ROS) [6,9]. ROS in cells are neutralized by both enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems. Glutathione reduction (GSH) represents a principal marker for the non-enzymatic antioxidant mechanisms because it is widely distributed among organisms. Among the enzymatic antioxidant mechanisms, superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) are the most studied [9]. On many occasions, the general redox state of an organism is used to represent the total antioxidant capacity (TAC), which denotes a balance between the generation of ROS and the hen ROS production exceeds the antioxidant capacity, resulting in the generation of lipid peroxidation (LPO), protein oxidation and DNA damage that can lead to cell death. This mechanism of damage has been associated with the development of several chronic degenerative pathologies, including diabetes mellitus, hypertension, and cardiovascular disease [9]. Several studies have shown that the alteration of antioxidant capacity in stress induced by immobilization, cold, and cold water immersion for 21 days in Wistar rats is associated with oxidative stress in different organs (liver, kidney, heart, stomach, lung, and brain) and effects on erythrocytes [11–13].

The chronic stress increment favors neuronal apoptosis and reduces neurogenesis in the hippocampus [14], which leads to a reduction in the hippocampal volume [14,15]. Specifically, exposure to CUMS for 40 days increased protein oxidation in the prefrontal cortex, hippocampus and striatum and lipid peroxidation (LPO) in the cerebellum and striatum [6].

Although oxidative stress is involved in the appearance and complication of various diseases, at present there is no experimental evidence of a pancreas condition or oxidative stress induced by physiological stress markers in the pancreas. However, the pancreas is heavily involved in the pathogenesis of metabolic chronic degenerative diseases.

The interaction of the stress response and the immune system differs with the exposure time. The activation of the  $\beta$ -adrenergic receptor produces an acute inflammatory process, whereas the function of glucocorticoids is anti-inflammatory [16]. Chronic stress can also increase pro-inflammatory cytokine levels, such as tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) and interleukin 6 (IL-6) [4], which are potential sources of ROS [17]. Excessive ROS production due to the chronic stress effect is also related to complications observed in patients with diabetes mellitus [8,18].

Although alterations such as chronic hyperglycemia have been demonstrated to favor oxidative stress [8] and inflammation [18], the damage mechanisms implicated in the metabolic alterations generated by physiological stress have not been sufficiently studied. The purpose of this work was to determine the redox state of the liver and pancreas and the inflammatory profile in rats subjected to 20, 40, and 60 days

of CUMS. Reduced glutathione (GSH), lipid peroxidation (LPO), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total antioxidant capacity (TAC), and protein oxidation activity were detected. Additionally, the inflammatory profile was measured through the quantification of serum cytokine levels (IL-6, TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-10).

## 2. Materials and methods

Three-month-old male Wistar rats with weights ranging from 250 g to 300 g were obtained from the experimental animal center at the UAM-Iztapalapa and housed with a light-darkness cycle of 12 h (9 am–9 pm) with water and food (Harlan) provided ad libitum. The animals were separated into a control group (each time point had its own control group,  $n = 15$ ) and groups subjected to 20, 40, and 60 stress days ( $n = 5$ ). The animals were maintained in 50  $\times$  30  $\times$  20 cm boxes (5 rats/box). Because no differences were found in the control groups between time points, the control group data are presented for only one group. The handling of the laboratory animals and experimental procedures were performed according to the national and international rules (NIH guidelines for the handling and care of animals), including the Official Mexican Rule (NOM-062-ZOO-999, revised 2001). This protocol was approved by the Ethic Committee at the Metropolitan Autonomous University (Session 1514, verified 3–15–14–2010–2018).

### 2.1. Chronic unpredictable mild stress (CUMS) model

The animals were separated into two groups and placed into separate rooms. The control group was manipulated only for box changing, whereas the experimental group was subjected to the CUMS model for 20, 40, and 60 days according to the protocol described by Willner [5,19] and used by Lucca et al. [6] with some modifications. The stressors used were: food privation (12 h), water privation (12 h), immobilization (1 h–3 h), cold (4  $^{\circ}$ C, 3 h), immobilization plus cold (4  $^{\circ}$ C, 1.5 h–2.5 h), cold water immersion (15  $^{\circ}$ C, 15 m), continuous light (24 h), isolation (2–3 days), strange object (plastic balls 10 cm in diameter, 3 h–5 h), box inclination (40 $^{\circ}$ , 5 h), overcrowding (15 animals per box, 8 h–24 h), wet bed (5 h–24 h) and noise (40 dB, 3 h–5 h). Stressors were applied randomly, with the stressor varying in frequency and time to avoid the animals' habituation (Table 1). The stressors were applied preferably at the beginning of the light phase between 9 am and 11 am.

To discard the effect of acute stress, the animals were sacrificed by decapitation one day after finalizing the stress procedure. Blood was collected and the organs extracted to process and analyze the samples. Serum was obtained by centrifuging the blood at 1500  $\times$ g for 10 min. The serum was stored at  $-70$   $^{\circ}$ C prior to corticosterone and cytokine analyses.

### 2.2. Corticosterone

For corticosterone determination, the animals were sacrificed 24 h after the stress procedure between 10 am and 11 am (one hour into the light phase). The corticosterone determination was performed in serum with a commercial ELISA kit (ALPCO Diagnostics, immunoassays, Salem, NH, USA). The optic density was determined photometrically at 450 nm.

### 2.3. Tissue analysis

The liver and pancreas were dissected and washed in a saline solution at 4  $^{\circ}$ C and separated. A total of 0.1 g of tissue was homogenized in 600  $\mu$ l of phosphate buffer (0.067 M, pH 7.8) and a protease inhibitor stock solution (Roche, Indianapolis, IN, USA) for the determination of the SOD, CAT, TAC and protein oxidation activities. A total of 0.1 g of tissue was homogenized in 600  $\mu$ l of sulfosalicylic acid for the GSH determination, and 0.1 g of tissue was homogenized in HPLC water for the

**Table 1**

Chronic unpredictable mild stress protocol applied to three-month old male Wistar rats for 20, 40, and 60 days.

Day	Stressor (time)	Day	Stressor (time)
1	Food deprivation (12 h)	31	Immobilization (2 h)
2	Water deprivation (12 h)	32	Persistent light (24 h)
3	Persistent light (24 h)	33	Food deprivation (12 h)
4	Overcrowding (24 h)	34	Wet bet (12 h)
5	Overcrowding (24 h)	35	Isolation plus foreign object (5 h)
6	Without stressor	36	Immersion in cold water (15 min)
7	Immersion in cold water (15 min)	37	Water deprivation (24 h)
8	Immobilization (1.5 h)	38	Immobilization plus cold (1.5 h)
9	Isolation (24 h)	39	Without stressor
10	Isolation (24 h)	40	Food deprivation (12 h)
11	Food deprivation (12 h)	41	Overcrowding (24 h)
12	Immobilization (2 h)	42	Persistent light (24 h)
13	Overcrowding (24 h)	43	Without stressor
14	Overcrowding (24 h)	44	Noise (3 h)
15	Persistent light (24 h)	45	Isolation (24 h)
16	Wet bet (12 h)	46	Water deprivation (24 h)
17	Immersion in cold water (15 min)	47	Immobilization plus cold (2 h)
18	Immobilization (1.5 h)	48	Foreign object plus noise (5 h)
19	Without stressor	49	Cage tilting 45° (5 h)
20	Food deprivation (12 h)	50	Food deprivation/overcrowding (24 h)
21	Persistent light (24 h)	51	Cold (3 h) plus persistent light (24 h)
22	Immobilization (2 h)	52	Water deprivation (24 h)
23	Water deprivation (12 h)	53	Persistent light (24 h)
24	Isolation (24 h)	54	Overcrowding (24 h) plus noise (5 h)
25	Isolation (24 h)	55	Immobilization (2 h)/overcrowding (24 h)
26	Cage tilting 45° (5 h)	56	Isolation (24 h)
27	Cold (3 h)	57	Foreign object (5 h)
28	Food deprivation (12 h)	58	Cold plus immobilization (2.5 h)
29	Immersion in cold water (15 min)	59	Noise (5 h) plus immersion cold water (15 min)
30	Overcrowding (24 h)	60	Without stressor

LPO determination. The tissue homogenate was re-suspended three times and left to rest for 5 min at 4 °C. Then, the homogenate was centrifuged at 8000 × g for 20 min at 4 °C. The supernatant containing the cytoplasmic proteins was aliquoted into small volumes and stored at –70 °C.

#### 2.4. GSH

The determination was performed using a commercial BioVision™ glutathione colorimetric assay kit (Bioptics, Tucson, AZ, USA). GSH reacts with DTNB to produce 2-nitro-5-thiobenzoic acid, which produces a yellow color. The absorbance was read at 412 nm.

#### 2.5. Lipid peroxidation

Lipoperoxide levels in the tissue were determined with the Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay Kit (Calbiochem®, Gibbstown, NJ, USA). The Lipid Hydroperoxide Assay Kit measures hydroperoxides directly by utilizing redox reactions with ferrous ions. The samples were read at 500 nm.

#### 2.6. SOD

SOD activity was determined by the Winterbourn method [20], which is based on the ability of this enzyme to inhibit the reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) by superoxides generated by the reaction of riboflavin and oxygen photo-reduction. The samples were read at 560 nm. Enzyme activity is expressed as U of SOD/mg of protein.

#### 2.7. CAT

CAT enzyme activity was determined by the Beers and Sizer method [21]. This method is based in the consumption of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) by catalase. The samples were read at 240 nm. Catalase enzyme activity was expressed as mU per mg protein per minute.

#### 2.8. Total antioxidant capacity

This measurement was determined using the BioVision™ Total Antioxidant Capacity Assay (TAC) (Bioptics, Tucson, AZ, USA). Trolox was used to standardize the antioxidants, and all other antioxidants were measured in Trolox equivalents. The reduced Cu<sup>+</sup> ion is chelated with a colorimetric probe, resulting in a broad absorbance peak at approximately 570 nm that is proportional to the total antioxidant capacity. The samples were read at 570 nm.

#### 2.9. Protein oxidation: OxyBlot analysis

Oxidative modification of proteins generates protein carbonyl groups, which are a hallmark of the oxidation status of all proteins. The level of protein oxidation was determined using the Oxidized Protein Detection Kit (OxyBlot, Chemicon Internacional, Temecula, CA, USA) according to the manufacturer's instructions.

The OxiBlot assay was performed according to the method described by Rice et al. [22]. The OxyBlot kit derivatizes carbonyl groups to a 2,4-dinitrophenylhydrazone (DNPH) moiety. Protein bands were visualized with the Luminata crescendo (HRP substrate, Millipore). For the data presentation, an optical density analysis was performed to obtain images with the ImageJ program, version 1.45. The results were expressed as relative levels of oxidized protein.

#### 2.10. Protein concentration

The protein concentration was determined by the Bradford method [23] using bovine serum albumin as a standard and the BioRad Bradford (BioRad, Hercules, CA, USA). The absorbance was measured at 595 nm.

#### 2.11. Cytokines

Cytokines were determined with the ELISA method using commercial kits with the reactivities specified by each supplier for assays in rats: Preprotech (Rocky Hill, NJ, USA) for IL-1β and IL-6, Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) for TNFα and ALPCO Diagnostics (Salem, NH, USA) for IL-10. The ELISA plates were read with a Prism spectrophotometer (Thermo Scientific Multiskan GO) at the wavelengths specified by each supplier.

#### 2.12. Statistical analysis

The assays were run in duplicate. The results are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM). To assess differences between the different stress time points compared to the control group, a variance analysis (ANOVA) was performed with the Tukey–Kramer method post-hoc analysis with *p* < 0.05. Data were analyzed using the NCSS (Number Cruncher Statistical System) statistical program.

### 3. Results

#### 3.1. Effect of CUMS on corticosterone levels

CUMS increased the corticosterone levels after 20 days. This increase was maintained until day 60 of the stress protocol [*F* = (3.26) = 8.7, *p* < 0.05] (Table 2).

**Table 2**

Serum corticosterone levels in rats subjected to 20, 40, and 60 days of CUMS. Each value represents the mean  $\pm$  SEM. Control:  $n = 15$ ; CUMS:  $n = 5$ . ANOVA, Tukey–Kramer.

	Corticosterone ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )
Control	3.33 $\pm$ 1.33
CUMS 20 days	8.76 $\pm$ 1.41*
CUMS 40 days	9.04 $\pm$ 1.51*
CUMS 60 days	8.11 $\pm$ 1.33*

\* Significant difference compared with the control ( $P < 0.05$ ).

### 3.2. Chronic unpredictable mild stress effect on GSH levels

The GSH levels are shown in Fig. 1. In the liver, the GSH concentration (Fig. 1A) was increased only from day 20 in animals subjected to CUMS [ $F(3,26) = 6.473$ ,  $p < 0.05$ ]; no change was detected on stress days 40 and 60. Conversely, in the pancreas a gradual reduction in the GSH concentration was observed from day 40 of the experiment [ $F(3,26) = 5.632$ ,  $p < 0.05$ ] (Fig. 1B).

### 3.3. Effect of CUMS on LPO

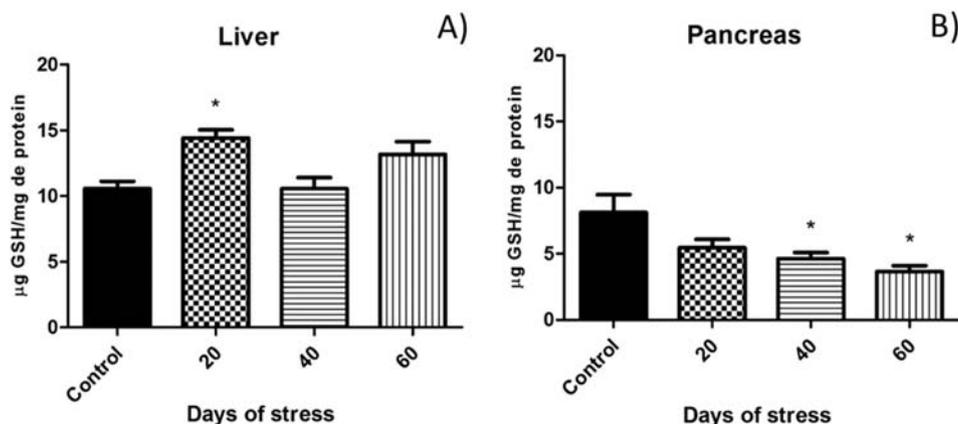
The LPO levels are shown in Fig. 2. The lipoperoxide concentration increased significantly ( $p < 0.05$ ) in the liver on day 60 of stress [ $F(3,26) = 5.17$ ,  $p < 0.05$ ] (Fig. 2A), while in pancreas the LPO level increased from day 20 [ $F(3,26) = 5.3$ ,  $p < 0.05$ ] until day 60 of the CUMS (Fig. 2B).

### 3.4. Effect of CUMS on antioxidant enzyme activity (SOD and CAT)

The enzymatic SOD and CAT activities in the liver and pancreas in response to CUMS are shown in Fig. 3. The SOD activity was not modified in the liver (Fig. 3A); however, CAT activity was significantly reduced at day 20 of stress [ $F(3,26) = 6.08$ ,  $p < 0.05$ ] compared to the control group (Fig. 3C). The SOD activity in the pancreas was significantly increased at day 60 of CUMS (Fig. 3B). Exposure to CUMS did not induce modification of the CAT activity in the pancreas (Fig. 3D).

### 3.5. Effect of CUMS on the total antioxidant capacity (TAC)

CUMS did not modify the TAC in the liver (Fig. 4A). In the pancreas, a progressive decrease was observed [ $F(3,26) = 4.28$ ;  $p < 0.05$ ] over time, although it was significant only after 50 days of treatment, with levels of  $4.16 \pm 0.52$  nmol TAC/mg of protein in contrast to the control, whose levels were  $6.59 \pm 0.44$  nmol TAC/mg of protein (Fig. 4B).



**Fig. 1.** Effect of CUMS on GSH levels in the liver (A) and pancreas (B) of rats subjected to 20, 40, and 60 days of CUMS. Mean  $\pm$  SEM, Control:  $n = 15$ ; CUMS:  $n = 5$ . ANOVA, Tukey–Kramer. \*Significant difference compared to the control ( $p < 0.05$ ).

### 3.6. Effect of CUMS on protein oxidation

The increase in protein oxidation is shown in Fig. 5. A progressive increase in protein oxidation in the liver [ $F(3,26) = 22.91$ ;  $p < 0.01$ ] and pancreas [ $F(3,26) = 54.68$ ;  $p < 0.01$ ] was found from day 40 up to day 60 of stress (Fig. 5A and B). A representative gel is shown to illustrate the progressive increase in oxidized proteins in both tissues.

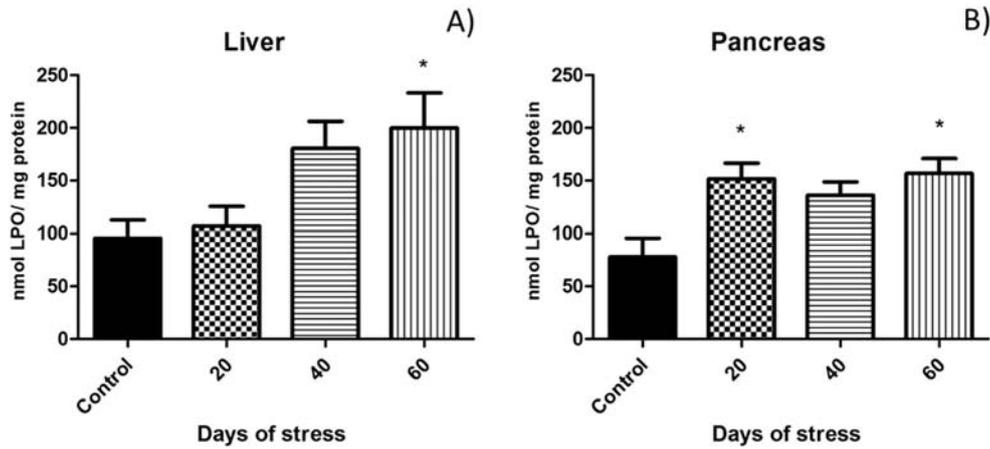
### 3.7. Effect of CUMS on inflammatory processes

The effect of CUMS on serum cytokine levels is shown in Fig. 6. CUMS increased the serum levels of IL-1 $\beta$  [ $F(3,21) = 3.7$ ;  $p < 0.05$ ] at day 60 of treatment compared to the control group (Fig. 6A). The serum levels of TNF $\alpha$  showed a significant increase [ $F(3,21) = 11.24$ ;  $p < 0.05$ ] at day 20 ( $184.55 \pm 1.75$  vs  $301.42 \pm 8.18$  pg/ $\mu\text{l}$ ) (Fig. 6B). In contrast, IL-6 was increased significantly [ $F(3,21) = 7.06$ ;  $p < 0.05$ ] from day 20 of CUMS until day 60 (Fig. 6C). CUMS increased IL-10 ( $F(3,13) = 12.78$ ;  $p < 0.05$ ) at day 40 of stress ( $51.43 \pm 5.43$  ng/mL), although this cytokine was decreased at day 60 ( $10.46 \pm 1.148$  ng/mL) compared to the control group ( $20.83 \pm 0.92$  ng/mL) (Fig. 6D).

## 4. Discussion

This work provides evidence and new data concerning oxidative stress production and systemic inflammation as a response to CUMS, which may be associated with the damage generated in chronic degenerative diseases such as diabetes mellitus. Although circadian variations in corticosterone levels can be considered another consequence of the effect of chronic stress, these variations were not determined in the present work. Blood samples were collected 24 h after applying the final stressor to discard the acute effect of stress generated in the animals. Previous studies have applied CUMS only up to 40 days [6]. A decrease in the intensity of the stress response has been demonstrated when only one stressor is chronically applied [13,24,25], which prevents its use for longer periods of time. Similarly, very few studies have included time cuts. Zardoos et al. [26] showed that a higher response intensity was present after 15 days in the restraint model, but alterations were reestablished at 30 days [26,27]. This finding was explained as an adaptation process because the stressor was repetitive and could cause habituation in the animals [28,29].

Energy mobilization is a primary result of the fight or flight response [7]. The quantification of physiological and metabolic parameters was excluded in the present study because this topic was previously reported in the literature [7,26]. Stress is a potential contributor to the chronic hyperglycemia in diabetes [30]. Metabolic alterations due to stress and glucocorticoids favor glycogenolysis activation, glyconeogenesis, lipid



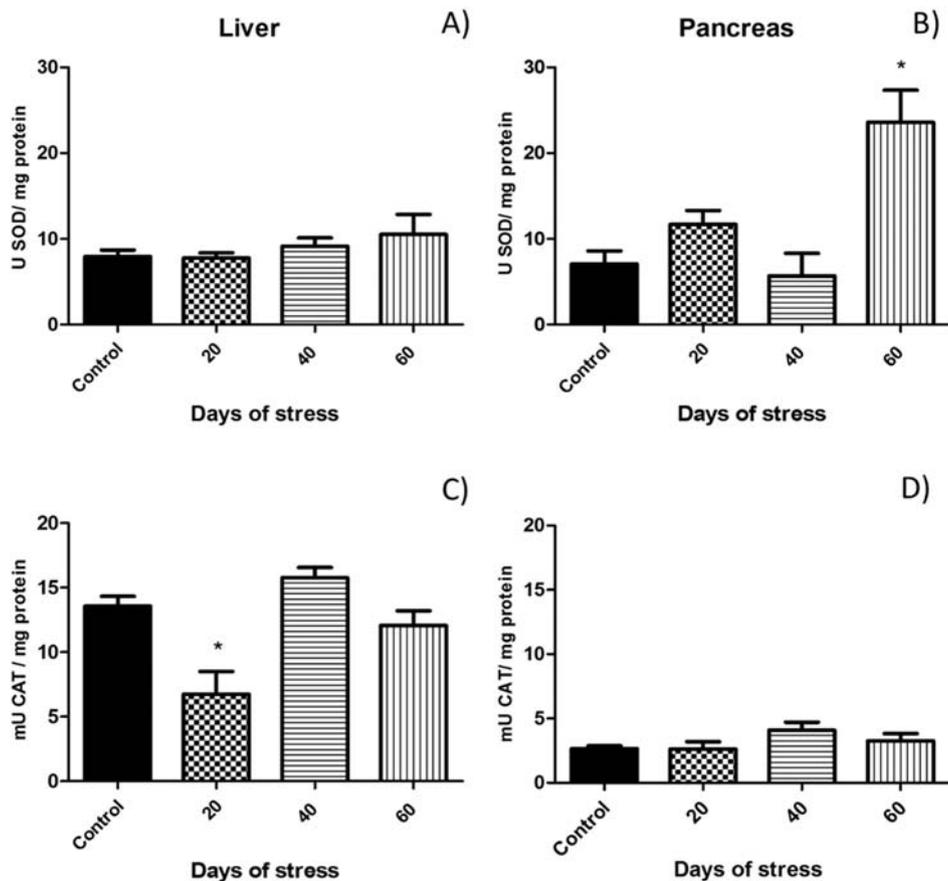
**Fig. 2.** Effect of CUMS on LPO in the liver (A) and pancreas (B) of rats subjected to 20, 40, and 60 days of CUMS. Mean  $\pm$  SEM, Control:  $n = 15$ ; CUMS:  $n = 5$ . ANOVA, Tukey–Kramer. \*Significant difference compared to the control ( $p < 0.05$ ).

mobilization and protein synthesis inhibition [30–32], thereby generating oxidative stress. In our unpublished data, we observed that CUMS did not alter food and water intake. However, CUMS decreased body mass. Additionally, CUMS altered the metabolism of carbohydrates and lipids, as was previously reported by Zardoos et al. [26].

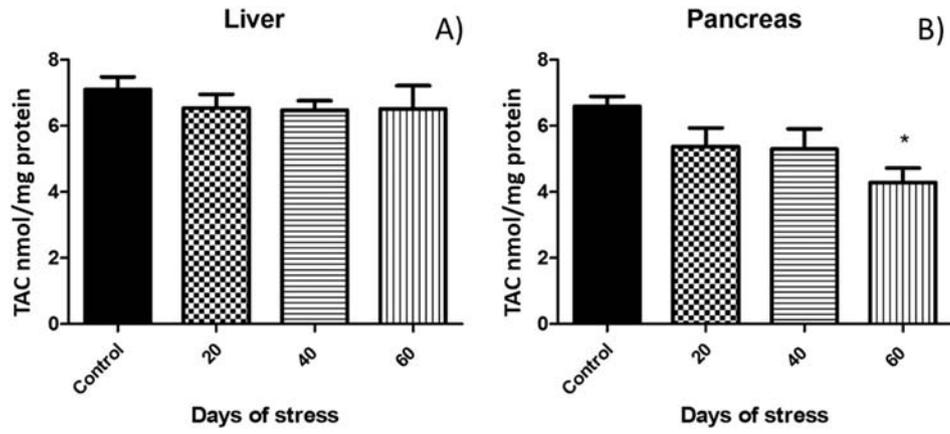
Different types of chronic stress have been related to oxidative stress production in the liver, kidney, heart, lungs, and brain [6,11–13,27]. In the present study, CUMS increased hepatic LPO at 60 days and pancreatic LPO at 20 and 60 days. Moreover, an increase in oxidative proteins was shown both in the liver and pancreas at 40 and 60 days. These

results suggest that higher ROS production occurred in both organs as a result of response mechanisms to stress at the cellular level [33]. In liver, protein oxidation can be due to that this organ modulates the metabolic alterations by glucocorticoids and adrenaline, as a response to stress.

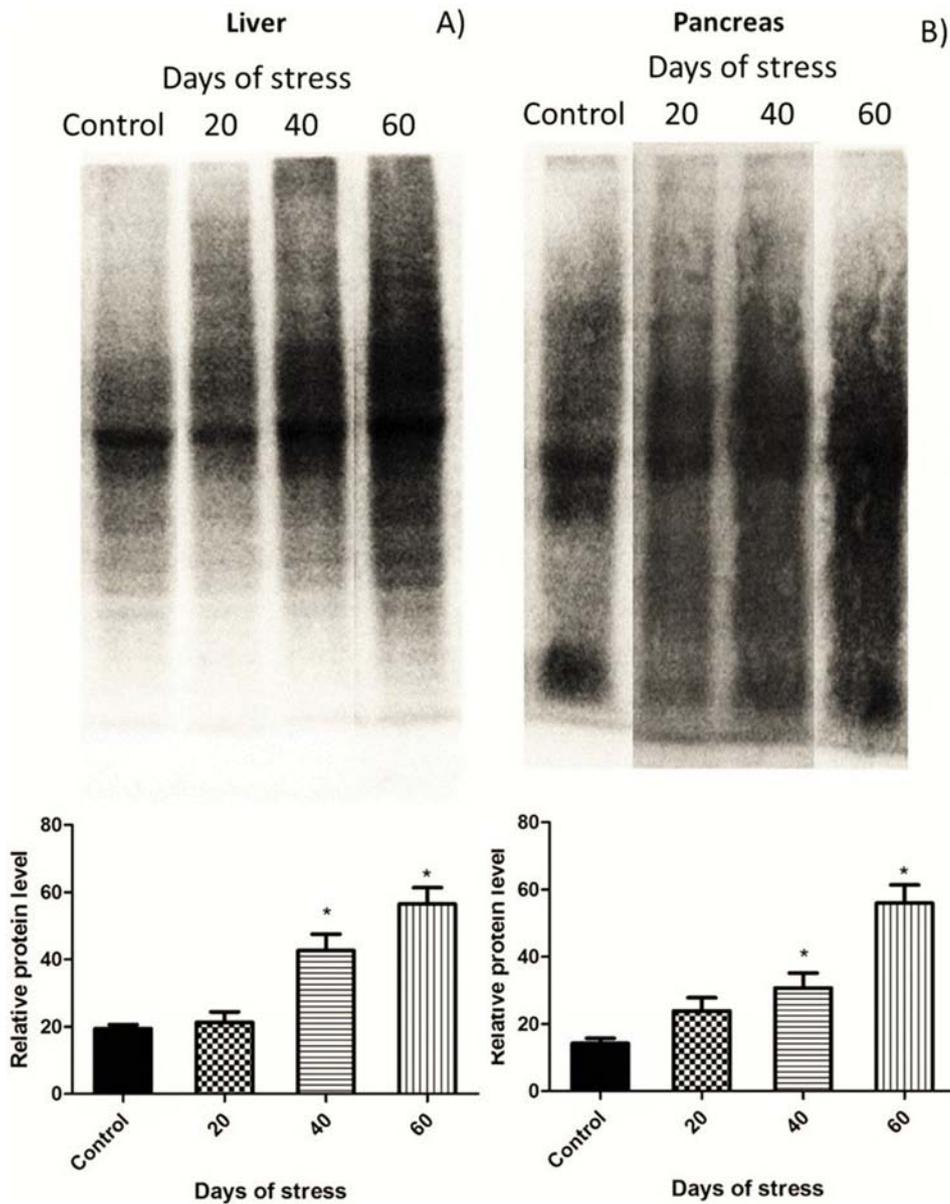
The pancreas is an organ that does not participate in the regulation of the redox state of the organism. In contrast, the liver is considered to be the regulatory organ for the redox state [27,34]. This knowledge has propitiated attention that is focused on the liver, whereas the pancreas is ignored in the majority of studies. However, the pancreas is



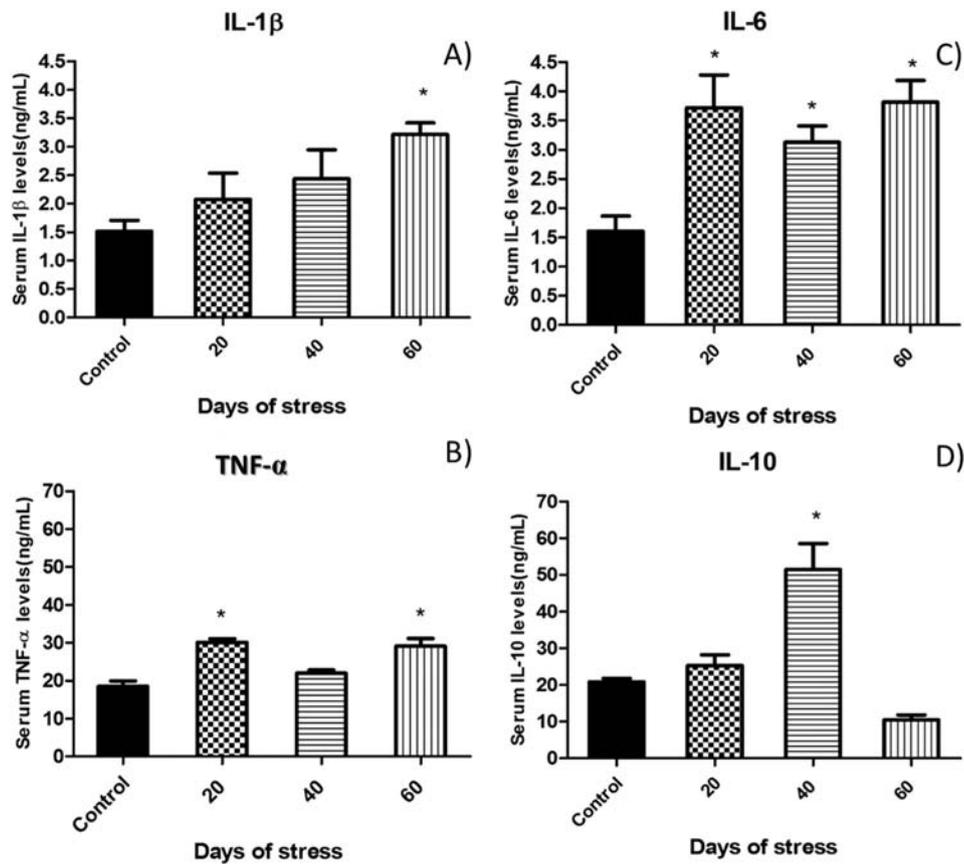
**Fig. 3.** Effect of CUMS on enzymatic SOD and CAT activity in the liver (A and C, respectively) and pancreas (B and D, respectively) of rats subjected to 20, 40, and 60 days of CUMS. Mean  $\pm$  SEM, Control:  $n = 15$ , CUMS = 5. ANOVA, Tukey–Kramer. \*Significant difference compared to the control ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 4.** Effect of CUMS on the total antioxidant capacity (TAC) in the liver (A) and pancreas (B) of rats subjected to 20, 40, and 60 days of CUMS. Mean  $\pm$  SEM, Control:  $n = 5$ , CUMS:  $n = 5$ . ANOVA, Tukey–Kramer. \*Significant difference compared to the control ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 5.** Effect of CUMS on the protein oxidation in the liver (A) and pancreas (B) of rats subjected to 20, 40, and 60 days of CUMS. An increase in the protein oxidation was observed in both tissues following exposure to CUMS. Mean  $\pm$  SEM, Control:  $n = 15$ , CUMS:  $n = 5$ . ANOVA, Tukey–Kramer. \*Significant difference compared to the control ( $p < 0.05$ ).



**Fig. 6.** Effect of CUMS on serum cytokine levels in rats subjected to 20, 40, and 60 days of CUMS: IL-1 $\beta$  (A), IL-6 (B), TNF $\alpha$  (C) and IL-10 (D). Mean  $\pm$  SEM. ANOVA, Tukey–Kramer. \*Significant difference compared to the control ( $p < 0.05$ ).

important from a metabolic point of view because it regulates the metabolism of carbohydrates, lipids and proteins.

This work showed that the antioxidant system of the liver was generally more efficient than the pancreas. For instance, the liver maintained constant levels in the TAC assay, which measures the total efficacy of antioxidant mechanisms. However, antioxidant defense systems are not sufficient to counter reactive species production as a consequence of stress; therefore, protein oxidation and LPO in this organ are evident.

In the liver, the maintenance of GSH levels suggests efficient antioxidant activity [35] that is distinctive for this organ because the liver is the primary producer of this antioxidant system [35,36]. Conversely, a progressive decrease in the GSH level was observed in the pancreas that became significant from day 40 to day 60 of chronic stress, suggesting that the pancreas was more susceptible to alterations in the redox state in response to chronic stress.

The increase in free radical production was associated with a decrease in antioxidant enzyme activity [9,13,33,37]. In our results, CAT activity in the liver decreased significantly until day 20 of stress, whereas in the pancreas an increase in SOD activity was shown on day 60 of stress. These results suggest that both organs responded differently over time. SOD and CAT activity have been reported to be increased in the liver under stress by immobilization conditions at day 20 [38]. This is the first report of alterations in enzymatic activity in the pancreas due to chronic stress.

Increased oxidative stress markers, protein oxidation and LPO in both tissues suggest increased production of reactive oxygen. Clearly, in this study this effect was dependent on the time of production and concentration. Therefore, measurements of reactive species could be considered for future studies.

The relationship between chronic stress/oxidative stress is of great relevance because ROS production plays a dual role in the organism's physiological functions. ROS production favors the activation of transcription factors responsible for the regulation of genes relevant for growth and cellular differentiation [37,39,40]. Excess ROS production can result in the initiation, development, and complications of numerous diseases (i.e., cancer, cardiovascular disease, diabetes mellitus type 2, cataracts, rheumatoid arthritis, or neurodegenerative diseases) [12,17,26,27,37].

Glucocorticoid and catecholamine circulation can stimulate immune system activation by interacting with immune cell receptors [41]. Gu et al. [42] suggested that an association between glucocorticoids and TLR-type receptors could mediate the inflammatory process. We have shown that CUMS has an effect on the inflammatory profile at 20 days, resulting in an increase in TNF $\alpha$  and IL-6; at 40 days, this alteration is attenuated. This attenuation might be due to the increase in the anti-inflammatory cytokine IL-10 that was diminished at 60 days. This decrease in IL-10 was associated with an increase in all of the pro-inflammatory cytokines tested (IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-6) and favored the establishment of a low-grade inflammatory state approximately 60 days after CUMS.

NF- $\kappa$ B activation stimulates the expression of pro-inflammatory cytokines and contributes to oxidative stress [43]. This process was uncontrolled after 40 days of chronic stress, resulting in low-grade inflammation after approximately 60 days of CUMS. Although the relationship between oxidative stress and the activation of inflammatory pathways is not very well known, reactive oxygen species have been suggested to stimulate NF- $\kappa$ B activation, which is situated in the crossover of inflammatory and oxidative stress [44].

Chronic stress not only induces an inflammatory response, but cytokines also exert an effect on the adrenal axis. Studies in stress models in

rodents have shown that inflammatory mediator molecules induce behavioral changes. Jiang et al. [45] reported that 20 days of CUMS increased NF- $\kappa$ B activation and IL-6 and TNF $\alpha$  expression in the prefrontal cortex and hippocampus of rats. After 40 days of CUMS, the animals showed aggressive behavior, although no lesions that interfered with the cytokine results were observed at any time during the stress protocol. Therefore, the changes observed in the cytokines must be the result of CUMS.

The responses obtained with the CUMS model suggest a series of processes comparable to the general adaptation syndrome suggested by Selye [46], in which the individual can no longer counter the stress effects. The effects surpass the resistance capacity at 40 days and reach a phase of exhaustion after 60 days of CUMS. Therefore, chronic stress alterations in the redox state of the liver and pancreas favor low-grade systemic inflammation after approximately 60 days of treatment that can precede the development of chronic degenerative diseases.

## 5. Conclusions

The time course of the effects of chronic stress on the liver, pancreas and inflammatory profile is shown in Fig. 7. Notably, depletion occurs with increased damage markers by reactive species after 40 and 60 days in both tissues, resulting in an environment that favors low-grade inflammation after 60 days of CUMS.

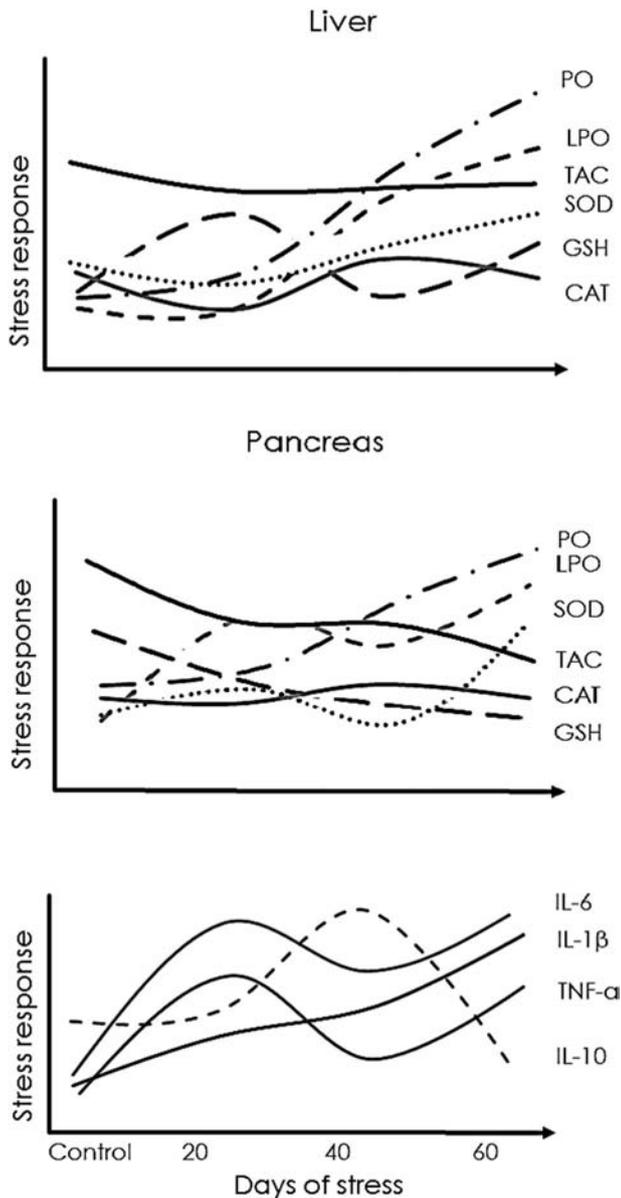
The liver has been shown to possess a more efficient antioxidant system. Thus, the pancreas is a more susceptible organ to reactive species damage because it presents a diminishment in its antioxidant capacity and an enhancement of LPO after 40 days of CUMS.

The results at 40 days of CUMS are suggestive of the loss of resistance and the appearance of the exhaustion phase.

CUMS is an animal model that avoids habituation, resulting in the production of oxidative stress and low-grade systemic inflammation, which allows the study of physio-pathological stress aspects for periods of at least 60 days.

## References

- [1] B.S. McEwen, Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840 (1998) 33–44.
- [2] C. Tsigos, G.P. Chrousos, Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress, *J. Psychosom. Res.* 53 (2002) 865–871.
- [3] G.P. Chrousos, Stress and disorders of the stress system, *Nat. Rev. Endocrinol.* 5 (2009) 374–381.
- [4] X.T. Lu, Y.X. Zhao, Y. Zhang, F. Jiang, Psychological stress, vascular inflammation, and atherogenesis: potential roles of circulating cytokines, *Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* 62 (2013) 1–6.
- [5] P. Willner, Chronic mild stress (CMS) revisited: consistency and behavioural-neurobiological concordance in the effects of CMS, *Neuropsychobiology* 52 (2005) 90–110.
- [6] G. Lucca, C.M. Comim, S.S. Valvassori, G.Z. Réus, F. Vuolo, F. Petronilho, F. Dal-Pizzol, E.C. Gavioli, J. Quevedo, Effects of chronic mild stress on the oxidative parameters in the rat brain, *Neurochem. Int.* 54 (2009) 358–362.
- [7] C.R. Teague, F.S. Dhabhar, R.H. Barton, B. Beckwith-Hall, J. Powell, M. Cobain, B. Singer, B.S. McEwen, J.C. Lindon, J.K. Nicholson, Metabonomic studies on the physiological effects of acute and chronic psychological stress in Sprague–Dawley rats, *J. Proteome Res.* 6 (2007) 2080–2093.
- [8] B.S. McEwen, J.C. Wingfield, The concept of allostasis in biology and biomedicine, *Horm. Behav.* 43 (2010) 2–15.
- [9] A.C. Maritim, R.A. Sanders, J.B. Watkins, Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 17 (2003) 24–38.
- [10] A. Zafir, N. Banu, Induction of oxidative stress by restraint stress and corticosterone treatments in rats, *Indian J. Biochem. Biophys.* 46 (2009) 53–58.
- [11] S. Gumuslu, B. Sarikcioglu, E. Sahin, A. Yargicoglu, Influences of different stress models on the antioxidant status and lipid peroxidation in rat erythrocytes, *Free Radic. Res.* 36 (2002) 1277–1282.
- [12] S. GümüŖlü, E. Sahin, Immobilization stress in rat tissues: alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system, *Comp. Biochem. Physiol.* 144 (2007) 342–347.
- [13] J.L. Warner-Schmidt, R.S. Duman, Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment, *Hippocampus* 16 (2006) 239–249.
- [14] S. Hiroya, T. Takeyuki, S. Kazumi, T. Hirokatsu, U. Shiro, Glucocorticoid generates ROS to induce oxidative injury in the hippocampus, leading to impairment of cognitive function of rats, *Clin. Biochem.* 47 (2010) 224–232.
- [15] G.P. Chrousos, The hypothalamic pituitary adrenal axis and immune mediated inflammation, *N. Engl. J. Med.* 332 (1995) 1352–1362.
- [16] S.E. Klings, W.H. Farber, Role of free radicals in the pathogenesis of acute chest syndrome in sickle cell disease, *Prog. Respir. Res.* 2 (2001) 280–285.
- [17] A. Mitra, Diabetes and stress: a review, *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 2 (2008) 131–135.
- [18] G.D. Gamaro, L.P. Manoli, I.L. Torres, R. Silveira, C. Dalmaz, Effects of chronic variable stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures, *Neurochem. Int.* 42 (2003) 107–114.
- [19] C.Ch. Winterbourn, E.R. Hawkins, M. Brian, R.W. Carrell, The estimation of cell peroxidase dismutase activity, *J. Lab. Clin. Med.* 85 (1975) 337–342.
- [20] R.F. Beers, L.W. Sizer, A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase, *Biol. Chem.* 195 (1952) 133–140.
- [21] K.M. Rice, S. Meduru, S.K. Kakarla, A. Katta, S.P. Mupparaju, B. Kidd, L.J. Goebel, E.R. Blough, Chronic paracetamol treatment influences indices of reactive oxygen species accumulation in the aging Fischer 344  $\times$  Brown Norway rat aorta, *Ann. Clin. Lab.* 42 (2012) 152–161.
- [22] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254.
- [23] M.S. Retana, J.H. Bonilla, P.G. Vázquez, S.E. Domínguez, G.R. Martínez, M.J. Velázquez, Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats, *Psychoneuroendocrinology* 2 (2003) 207–227.



**Fig. 7.** Effect of chronic stress over the time course on the liver, pancreas and inflammatory profile. Depletion occurs in both tissues, with increased damage markers by reactive species observed at 40 and 60 days that favors low-grade inflammation after 60 days of CUMS. PO: Protein oxidation; LPO: Lipoperoxidation; TAC: Total antioxidant capacity; SOD: Superoxide dismutase; GSH: Glutathione reduced; CAT: Catalase.

- [25] M.T. Marin, F.C. Cruz, C.S. Planeta, Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats, *Physiol. Behav.* 30 (2006) 29–35.
- [26] H. Zardooz, Asl S. Zahedi, M.K. Gharib Naseri, M. Hedayati, Effect of chronic restraint stress on carbohydrate metabolism in rat, *Physiol. Behav.* 30 (2006) 373–378.
- [27] M. Jafari, M. Salehi, H. Zardooz, R. Fatemeh, Response of liver antioxidant defense system to acute and chronic physical and psychological stresses in male rats, *EXCLI J.* 13 (2014) 161–171.
- [28] E.R. De Kloet, M. Joels, F. Holsboer, Stress and the brain: from adaptation to disease, *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (2005) 463–475.
- [29] J.M. Koolhaas, A. Bartolomucci, B. Buwalda, S.F. de Boer, G. Flügge, S.M. Korte, P. Meerlo, R. Murison, B. Olivier, P. Palanza, G. Richter-Levin, A. Sgoifo, T. Steimer, O. Stiedl, G. van Dijk, M. Wöhr, E. Fuchs, Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept, *Neurosci. Behav. Physiol.* 35 (2011) 1291–1301.
- [30] R.S. Surwit, M.S. Schneider, M.N. Feinglos, Stress and diabetes mellitus, *Diabetes Care* 15 (1992) 1413–1422.
- [31] A. Munck, A. Na'ray-Fejes-To' th, Glucocorticoid Action. *Physiology*, in: L.J. DeGroot (Ed.), *Endocrinology*, W.B. Saunders Co., Philadelphia 1995, pp. 1642–1656.
- [32] R.M. Salposky, M. Romero, U.A. Munck, How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions, *Endocr. Rev.* 21 (2000) 55–89.
- [33] B. Halliwell, Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life, *Plant Physiol.* 141 (2006) 312–322.
- [34] C.D. Klaassen, S.A. Reisman, Nrf2 the rescue: effects of the antioxidant/electrophilic response on the liver, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 244 (2010) 57–65.
- [35] S.C. Lu, Regulation of glutathione synthesis, *Mol. Asp. Med.* 30 (2009) 42–59.
- [36] M.M. Sarrasague, D.A. Barrado, M. Zubillaga, A. Hager, T.P.J. Boccio, Conceptos actuales del metabolismo del glutatión Utilización de los isótopos estables para la evaluación de su homeostasis, *Acta Bioquim. Clin.* 40 (2006) 45–54.
- [37] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncola, M.T.D. Croninc, M. Mazura, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, *Biochem. Cell Biol.* 39 (2007) 44–84.
- [38] X. Liu, Mori A. Wang, Immobilization stress-induced antioxidant defense changes in rat plasma: effect of treatment with reduced glutathione, *Int. J. Biochem.* 26 (1994) 511–517.
- [39] C.K. Sen, L. Packer, Antioxidant and redox regulation of gene transcription, *FASEB J.* 10 (1996) 709–720.
- [40] L. Covarrubias, D. Hernández-García, D. Schnabel, E. Salas-Vidal, S. Castro-Obregón, Function of reactive oxygen species during animal development: passive or active? *Dev. Biol.* 320 (2008) 1–11.
- [41] R. Gill, A. Tsung, T. Billiar, Linking oxidative stress to inflammation: Toll-like receptors, *Free Radic. Biol. Med.* 48 (2010) 1121–1132.
- [42] H.F. Gu, C.K. Tang, Y.Z. Yang, Psychological stress, immune response, and atherosclerosis, *Atherosclerosis* 223 (2012) 69–77.
- [43] S. Ruiz, P.E. Pergola, R.A. Zager, N.D. Vaziri, Targeting the transcription factor Nrf2 to ameliorate oxidative stress and inflammation in chronic kidney disease, *Kidney Int.* 83 (2013) 1029–1104.
- [44] M. Nita, A. Grzybowski, F.J. Ascaso, V. Huerva, Age-related macular degeneration in the aspect of chronic low-grade inflammation (pathophysiological inflammation), *Mediat. Inflamm.* 2014 (2014) 1–10.
- [45] H. Jiang, Z. Wang, Y. Wang, Y. Xie, Q. Zhang, Q. Luan, W. Chen, D. Liu, Antidepressant-like effects of curcumin in chronic mild stress of rats: Involvement of its anti-inflammatory action, *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 47 (2013) 33–39.
- [46] H. Selye, Stress and the general adaptation syndrome, *BMJ* 17 (1950) 1382–1392.