



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**CAMBIOS EN LOS MARCADORES DE ESTRÉS
OXIDATIVO EN DISTINTAS REGIONES DEL
CEREBRO DE RATA EN UN MODELO DE
ESTRÉS AGUDO POR INMOVILIZACIÓN:
EFECTO DE LA L-CARNITINA Y EL DIAZEPAM**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

LUIS ALEJANDRO MÉNDEZ CUESTA



**DIRECTOR DE TESIS:
DOCTOR ABEL SANTAMARÍA DEL ÁNGEL**

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Hoja de Datos del Jurado

<p>1. Datos del alumno Méndez Cuesta Luis Alejandro 58452742 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 303151090</p>
<p>2. Datos del tutor Doctor Abel Santamaría Del Ángel</p>
<p>3. Datos del sinodal 1 Doctora Rocío Salceda Sacanelles</p>
<p>4. Datos del sinodal 2 Doctora Carolina Escobar Briones</p>
<p>5. Datos del sinodal 3 Doctor Paul Carrillo Mora</p>
<p>6. Datos del sinodal 4 Doctora Sonia Galván Arzate</p>
<p>7. Datos del trabajo escrito Cambios en los marcadores de estrés oxidativo en distintas regiones del cerebro de rata en un modelo de estrés agudo por inmovilización: Efecto de la L-carnitina y el diazepam. 94 pp. 2010</p>

Agradecimientos

Agradezco al Doctor Abel Santamaría por haberme permitido aprender mucho en su laboratorio, por compartir sus conocimientos y por la dirección de la tesis.

A la Doctora Rocío Salceda Sacanelles por aceptar ser parte de mi jurado de titulación y por sus aportes en la revisión de esta tesis.

A la Doctora Carolina Escobar Briones por sus contribuciones realizadas a la tesis como sinodal y por su apoyo para la realización de las pruebas de corticosterona.

Al Dr. Paul Carrillo Mora por sus comentarios sobre la tesis. Por su asesoría en las técnicas empleadas y su ayuda en la perfusión de ratas. Pero sobre todo por apoyarme, orientarme, ser un gran profesor, un ejemplo a seguir como investigador y un amigo. Gracias por ser el Co-Tutor de este trabajo.

A la Dra. Sonia Galván Arzate, por las correcciones y puntualizaciones hechas en la tesis como sinodal, por su asesoramiento para la realización de la técnica de GSH y disección de regiones cerebrales, pero también por su apoyo y ánimos.

Al Dr. Roberto Salgado, Katia y el equipo de laboratorio del Dr. Buijs del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por su ayuda para la determinación de los niveles de corticosterona.

A la Dra. Verónica Pérez De La Cruz, por su asesoría académica y técnica en este trabajo, pero principalmente por ser también una gran profesora y por ser una gran amiga.

A la Bióloga Berenice Márquez Valadez por su ayuda incondicional durante la realización de los experimentos para esta tesis, su apoyo y sus ánimos.

A mis compañeros del laboratorio, la M. en C. Daniela, Rafa, las Biólogas Diana Elinos, Diana Pérez y Yolanda, al Q.F.B César, Alim, Yarummy y a las Dras. Irma y Mónica, con quienes trabajé y aprendí. Gracias por su apoyo, por ser más amena y divertida la estancia en el laboratorio. Los extrañaré mucho.

A la UNAM y Facultad de Ciencias, las cuales representan mi segundo hogar, no sólo por el conocimiento científico adquirido, sino también por forjar mis ideas, mi filosofía y mi cultura.

Al Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI), que otorga la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad, por el apoyo recibido para el desarrollo de esta investigación.

Dedicatorias

A mis padres Luis Alberto y Teresa, por el enorme sacrificio que representó el criarme y educarme, por los regañones, las enseñanzas, su sabiduría, pero sobre todo por ese gran amor que sólo ustedes pueden dar. Este logro es principalmente de ustedes, gracias por su apoyo incondicional. ¡Los amo mucho!

A mis hermanos, el M. en C. Carlos Alberto y la Ing. Ivone Patricia, por ser un ejemplo de superación y un modelo a seguir. Por su apoyo, su cariño y por hacerme una mejor persona. Los quiero mucho.

A mis abuelos paternos Braulio Méndez y Elvira Trinidad, por ser también un ejemplo de superación, por su cariño, apoyo y transmitirme sus experiencias.

A mis abuelos maternos Maximiliano y Alejandrina, por enseñarme el amor al trabajo, su fuerza y su persistencia, pero sobre todo por quererme tanto.

A todos los miembros de la Familia Méndez y Familia Cuesta, con quienes compartí grandes momentos, me mostraron su apoyo y transmitieron su conocimiento.

A Berenice, quién me permitió entrar a su vida y compartir momentos maravillosos a su lado, por su apoyo incondicional, por no dejarme desistir ante las adversidades y trasmitirme su fuerza, por enseñarme a luchar, por todas aquellas locuras que hemos vivido, por estar a mi lado en las buenas y en las malas experiencias, por comprender mi forma de ser, por significar mucho para mí, pero sobre todo por su amor y su linda sonrisa, ¡Te amo mucho hermosa!

A todas a mis amigos y compas de la facultad, Javier, Maira, Ulises, Oskis, Otilia, Adriana, Yazmín Anaín, Rafa (faico), Kin, Juan Carlos, Carlos (amigo de Guerrero), Adrián, Hilda, Jaime, Gaby, Rubén, Tania, Fidel, Fercho, Eric, Jorge, Gloria, Elsa, Diana Becerril y Estefania, con quienes compartí numerosas experiencias, me apoyaron, me acompañaron en las malas, y con quienes juntos aprendimos en este largo camino.

A mis amigos de la Prepa, que aún siguen apoyándome y pase momentos inolvidables Gaby, Leticia, Fabiola, Armando, Jorge, Bernardo (*"Benji"*), Maritza, Elena, Esmeralda, Paola e Itzel.

A todas ellas personas que me han acompañado durante este largo camino y con quien compartí muchos momentos, aquellos que han dejado huella en mí.

“El conocimiento es una aventura incierta que conlleva en sí misma y permanentemente el riesgo de ilusión y de error”

Edgar Morin

“Hasta la Victoria Siempre”

Ernesto “Che” Guevara

ÍNDICE

	Pág
RESUMEN.....	9
ABREVIATURAS.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1 El estrés.....	12
1.1.1 El estrés como concepto energético y el síndrome de adaptación general.....	12
1.1.2 El eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal.....	13
1.1.3 Corticosteroides.....	14
1.1.4 Los efectos de la respuesta adaptativa al estrés y la inducción de estrés oxidativo.....	15
1.2 Modelos de estrés.....	17
1.2.1 Estrés por aislamiento social.....	17
1.2.2 Estrés por hacinamiento.....	17
1.2.3 Estrés por dominancia social.....	18
1.2.4 Estrés por descarga eléctrica	18
1.2.5 Estrés por nado forzado.....	18
1.2.6 Estrés por privación del sueño.....	19
1.2.7 Estrés por inmovilización y sus efectos.....	19
1.3 El estrés oxidativo.....	21
1.3.1 Las especies reactivas del oxígeno y radicales libres.....	21
1.3.1.1 Ozono.....	22
1.3.1.2 Oxígeno singulete.....	23
1.3.1.3 Anión superóxido.....	23
1.3.1.4 Peróxido de hidrógeno.....	23

1.3.1.5	Radical hidroxilo.....	24
1.3.2	Las especies reactivas del nitrógeno.....	24
1.4	Fuentes de ERO.....	25
1.4.1	Reacción de Fenton y Haber-Weiss.....	25
1.4.2	Cadena respiratoria mitocondrial.....	26
1.4.3	Óxido nítrico sintasa.....	28
1.4.4	Citocromo P ₄₅₀	28
1.4.5	NADPH oxidasa.....	29
1.4.6	Xantina oxidoreductasa.....	31
1.5	Peroxidación de lípidos.....	31
1.6	Mecanismos antioxidantes.....	33
1.6.1	Superóxido dismutasa.....	34
1.6.2	Glutati3n reducido.....	35
1.6.3	Catalasa.....	38
1.7	El estrés oxidativo en el cerebro en modelos de estrés por inmovilizaci3n.....	39
1.8	L-carnitina.....	41
1.8.1	Rol fisiol3gico de la L-carnitina.....	41
1.8.2	La L-carnitina como antioxidante.....	43
1.9	Diazepam.....	44
1.9.1	Mecanismo de acci3n del diazepam.....	44
1.9.2	El efecto antioxidante/prooxidante del diazepam.....	47
2.	JUSTIFICACI3N.....	49
3.	HIP3TESIS.....	50
4.	OBJETIVOS.....	51
4.1	Objetivo general.....	51
4.2	Objetivos particulares.....	51

5. MÉTODO.....	53
5.1 Reactivos.....	53
5.2 Animales de experimentación.....	53
5.3 Procedimiento de inducción de estrés por inmovilización.....	54
5.4 Homogenado y fracciones sinaptosomales.....	55
5.5 Ensayo de la peroxidación de lípidos.....	56
5.6 Ensayo de la funcionalidad mitocondrial por MTT.....	57
5.7 Determinación de la actividad de la SOD.....	57
5.8 Determinación de los niveles de GSH.....	58
5.9 Determinación de los niveles de corticosterona.....	59
5.10 Análisis estadístico.....	59
5.11 Diagrama de flujo metodológico.....	60
6. RESULTADOS.....	61
6.1 Niveles de peroxidación lipídica.....	61
6.2 Funcionalidad mitocondrial.....	62
6.3 Actividad de la SOD.....	64
6.4 Niveles de GSH.....	65
6.5 Niveles de corticosterona.....	66
7. DISCUSIÓN.....	68
8. CONCLUSIONES.....	78
9. BIBLIOGRAFÍA.....	80

RESUMEN

El estrés está implicado en diversos trastornos: neurológicos, psiquiátricos y neurodegenerativos. En el presente estudio evaluamos el efecto del estrés por inmovilización aguda sobre diferentes marcadores de estrés oxidativo y disfunción mitocondrial en distintas regiones del cerebro de rata. Adicionalmente, evaluamos los efectos de la L-carnitina (L-CAR) y diazepam (DZ) en estos marcadores. Se formaron seis grupos con seis ratas cada uno: 1) Control (sin estrés); 2) Estrés; 3) L-CAR; 4) L-CAR + Estrés; 5) DZ; y 6) DZ + Estrés. El estrés fue inducido por inmovilización a los animales durante un periodo de 24 horas. La L-CAR (300 mg/Kg) y el DZ (1 mg/Kg) fueron administrados por vía intraperitoneal en dosis única inmediatamente antes de la sesión de inmovilización. Los niveles de lipoperoxidación (LP), funcionalidad mitocondrial (FM), actividad de la superóxido dismutasa (SOD), niveles de glutatión reducido (GSH) fueron medidos en diferentes regiones cerebrales (hipotálamo, estriado, hipocampo y corteza prefrontal). Así mismo se determinaron los niveles de corticosterona (CORT) en suero al final de la inmovilización. La exposición aguda a estrés por inmovilización incrementó los niveles de LP en casi todas las regiones, excepto en el hipocampo. Adicionalmente se observó una disminución no significativa en la FM en todas las regiones, acompañada de una disminución en la actividad de la SOD y disminución moderada de los niveles de GSH. La L-CAR demostró ejercer efectos protectores en los animales estresados, disminuyendo los niveles de LP en hipotálamo, estriado e hipocampo. Por su parte el DZ mostró efectos protectores sobre de los niveles de LP en animales estresados aunque este efecto dependió de la región estudiada. El estrés agudo induce un incremento en los niveles de LP, reduce los niveles de FM y disminuye la actividad de la SOD, dependiendo de la región cerebral. Por otro lado, la L-CAR y el DZ mostraron efectos protectores variables en los grupos de estrés, siendo también dependiente de la región. Los resultados variables pueden deberse a los efectos diferenciales del estrés y/o los fármacos sobre las diferentes regiones cerebrales, así como de la susceptibilidad de cada región, o de las condiciones preexistentes de los tejidos evaluados.

ABREVIATURAS

Ácido tiobarbitúrico.....	TBA
Ácido- γ -aminobutírico.....	GABA
Anión superóxido.....	$O_2^{\bullet -}$
Benzodiazepinas.....	BDZ
Catalasa.....	CAT
Cobre/zinc superóxido dismutasa.....	Cu/Zn-SOD
Diazepam.....	DZ
Dióxido de nitrógeno.....	NO_2^{\bullet}
Especies reactivas del nitrógeno.....	ERN
Especies reactivas del oxígeno.....	ERO
Funcionalidad mitocondrial.....	FM
Glutación oxidado.....	GSSG
Glutación peroxidasa.....	GPx
Glutación reducido.....	GSH
Glutación reductasa.....	GR
Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal.....	HPA

Hormona adrenocorticotrópica.....	ACTH
Hormona liberadora de corticotropina.....	CRH
L-carnitina.....	L-CAR
Malondialdehído.....	MDA
Manganeso superóxido dismutasa.....	Mn-SOD
NADPH oxidasa.....	NOX
Óxido nítrico.....	NO [•]
Óxido nítrico sintasa.....	NOS
Oxígeno singulete.....	¹ O ₂
Ozono.....	O ₃
Peroxidación de lípidos.....	PL
Peroxinitrito.....	ONOO ⁻
Radical Hidroxilo.....	HO [•]
Superóxido dismutasa.....	SOD
Superóxido dismutasa extracelular.....	Ec-SOD
Xantina oxidorreductasa.....	XOR

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El estrés

El estrés puede ser definido como una situación súbita e inesperada (por ejemplo, un estresor químico, físico, ambiental, emocional o psicosocial) que altera un determinado balance (homeostasis), y por lo tanto induce una respuesta adaptativa al estrés designada a restaurar los niveles iniciales de estabilidad (Selye, 1936).

Hans Selye (1950) define a la respuesta adaptativa al estrés como el Síndrome de Adaptación General (SAG), la cual depende de la función del Sistema Nervioso, y subsecuentemente ésta permite los cambios importantes para la adaptación.

1.1.1. El estrés como concepto energético y el Síndrome de Adaptación General

El SAG es propuesto como un concepto de adaptación de energía y consta progresivamente de tres estados que representan los procesos energéticos producidos durante el estrés: I) *La reacción de alarma* representa la movilización de la energía, en un corto tiempo, para emplearse en caso de ser necesario; II) *El estado de resistencia* emplea las fuentes de energía y compensa la falta de ésta con producción de energía de los compartimentos de reserva; y III) *El estado de cansancio* implica cuando las fuentes de energía están agotadas (Selye y Fortier, 1950).

1.1.2. El eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal

Fisiológicamente, el estrés induce una respuesta que involucra cambios centrales y periféricos (sistema endócrino) coordinados por el sistema nervioso central. La liberación de glucocorticoides, las principales hormonas del estrés, es controlada por el núcleo paraventricular del hipotálamo, donde las neuronas parvocelulares sintetizan y secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en respuesta al estrés (Pardon, 2007). Estas neuronas también liberan otras hormonas, como la arginina vasopresina, la cual actúa sinérgicamente con la CRH para modular el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal (HPA), el mayor componente neuroendócrino de la respuesta al estrés (Pardon y Rattray, 2009). La liberación de la CRH dentro del sistema de la pituitaria causa la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), y en consecuencia esta hormona viaja por el torrente sanguíneo desencadenando la síntesis y liberación de glucocorticoides de la corteza suprarrenal (Figura 1) (Pardon, 2007).

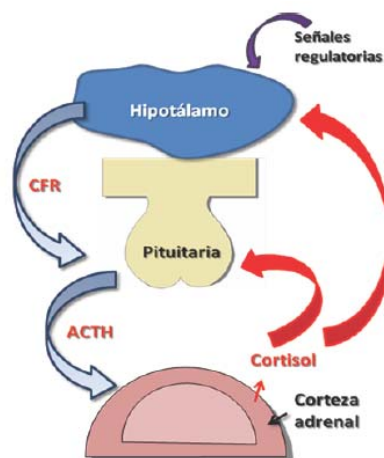


Figura 1. Esquema de los pasos de la liberación de hormonas que regulan el eje HPA. CRF: Hormona liberadora de corticotropina, ACTH: Hormona adrenocorticotrópica. Las flechas rojas muestran una retroalimentación negativa.

El principal glucocorticoide es conocido en el humano y primates como cortisol (Figura 2A), mientras que en los roedores son mejor conocidos como corticosterona (Figura 2B).

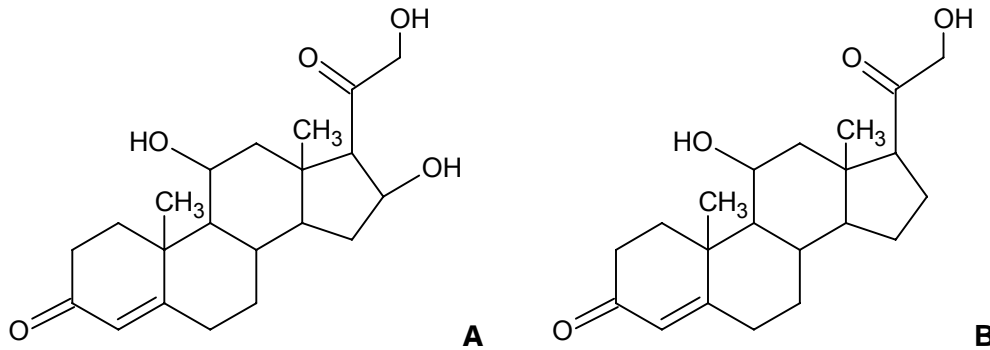


Figura 2. Estructura química del cortisol (A) y la corticosterona (B)

1.1.3. Corticosteroides

El cerebro es el mayor blanco de acción de los corticosteroides, y está ampliamente documentado que éstos se unen a dos tipos de receptores: los receptores de glucocorticoides (RG) y los receptores de mineralcorticoides (RM) (Meijer, 2006). Ambos receptores juegan un importante papel en la regulación de la actividad del eje HPA: los RM mantienen la actividad basal del eje HPA, mientras que los RG facilitan la retroalimentación negativa bajo la proporción de la concentración de glucocorticoides en respuesta al estrés (De Kloet et al., 1998).

Los RG Y RM son mejor conocidos como receptores nucleares, ya que son proteínas intracelulares que cuando son activadas por la hormona se translocan del citoplasma al núcleo y actúan como factores de transcripción (Meijer, 2006). Cuando los RG se unen a su ligando, se disocian de una proteína “heat shock” 90

para posteriormente formar un dímero que se une al elemento de respuesta de glucocorticoides en el ADN (Karin, 1998).

Estudios recientes se han concentrado en elucidar que genes pueden modular transcripcionalmente los glucocorticoides. Actualmente se sabe que los glucocorticoides están involucrados en una gran variedad de diferentes procesos celulares en diversos tejidos, entre los cuales destaca su función como reguladores de la energía del metabolismo y el control de glucosa en la sangre, el control en transducción de señales, la estructura neuronal, la dinámica de vesículas, la adhesión celular y factores neurotróficos (Datson et al., 2008).

1.1.4. Los efectos de la respuesta adaptativa al estrés y la inducción del estrés oxidativo

Las manifestaciones de las respuestas adaptativas al estrés son benéficas para el organismo hasta cierto punto: cuando la duración de exposición al estrés es excesiva, puede ser perjudicial debido a que se sobrepasa la capacidad de respuesta al mismo el organismo.

El estrés crónico ha demostrado afectar una variedad de respuestas, incluyendo la psicológica, la inmunológica, la endócrina, los procesos de desarrollo, e incluso puede tener efectos sobre la expresión de desórdenes como la arterosclerosis, la depresión, la toxicidad a nivel del Sistema Nervioso y el desarrollo de enfermedades infecciosas (Buynitsky y Mostofsky, 2009).

Se sabe que el estrés es un factor etiológico importante en distintos tipos de patologías severas como la cardiovascular, la inmunológica, las

neurodegenerativas y las psiquiátricas. Adicionalmente, ciertos estudios han evidenciado que el estrés tiene un rol importante en los procesos fisiológicos que ocurren en el envejecimiento (Esch et al., 2002; Swaab et al., 2005; Bao et al., 2008).

Se estima que hoy en día la gran mayoría de las personas están expuestas a los efectos negativos del estrés psicosocial, especialmente en las grandes ciudades (Esch et al., 2002). Resulta importante destacar que los desórdenes de ansiedad son uno de los desordenes psiquiátricos más comunes en el mundo, con una ocurrencia de 13 a 17 % en la población (Bandelow et al., 2002), pudiendo ser el estrés psicosocial de la vida diaria la posible causa del incremento en los desórdenes de ansiedad (Bijl et al., 1998; Turner y Lloyd, 2004).

Aunque aún existe un gran debate sobre como el estrés puede inducir daño sobre los diversos tejidos y células (McEwen, 2000), hoy se sabe que algunas formas de estrés, como el estrés oxidativo, se encuentran constantemente generando daño celular y se relacionan con la respuesta adaptativa al estrés. Esto se debe a que durante la condición de estrés hay un incremento en la tasa metabólica generando una gran cantidad de radicales libres, los cuales en exceso generan un estado de estrés oxidativo que es químicamente dañino para la célula (Pardon, 2007). Sin embargo, los mecanismos por los cuales el estrés genera radicales libres aún no han sido bien estudiados ni comprendidos.

Diversos estudios sobre modelos inductores de estrés en roedores han reportado que éstos pueden generar un daño oxidativo sobre varias

macromoléculas como los lípidos, las proteínas y el ADN en diversos órganos, principalmente en corazón (Şahin y Gümüşlü, 2007a), estómago (Liu et al., 1994; Şahin y Gümüşlü, 2007b; İzgüt-Uysal et al., 2007), hígado (Glavin et al., 1994; Liu et al., 1996; Şahin y Gümüşlü, 2007a; Şahin y Gümüşlü, 2007b), riñón (Liu et al., 1996; Şahin y Gümüşlü, 2007a; Şahin y Gümüşlü, 2007b) y cerebro (Glavin et al., 1994; Liu et al., 1996; Zaidi y Banu, 2004; Buynitsky y Mostofsky, 2009).

1.2. Modelos de estrés

Existe una gran variedad de modelos experimentales de inducción de estrés que pueden producir daño oxidativo, ya sea por procedimientos físicos o incluso psicológicos, siendo los roedores los animales de experimentación más empleados (Bierhaus et al., 2003; Liu y Mori, 1999).

1.2.1. Estrés por aislamiento social

Uno de los modelos de estrés psicológico ampliamente usado en roedores es el llamado aislamiento social, el cual consiste en separar a cada uno de los animales y colocarlos en pequeñas cajas, de tal manera que quedan aislados visual y físicamente de los demás (Dong et al., 2008).

1.2.2. Estrés por hacinamiento

Otro modelo inductor de estrés psicológico consiste en colocar múltiples individuos de experimentación en un lugar reducido, de tal manera que los animales quedan encimados unos con otros, este modelo es conocido como estrés por hacinamiento (Catania et al., 2009).

1.2.3. Estrés por dominancia social

El estrés por dominancia social es un modelo inductor de estrés psicológico en el que se emplean los machos de una cepa de rata con una conducta agresiva y con un peso mayor (por ejemplo, la cepa Long-Evans). Estas se colocan en una caja junto a las hembras de la cepa a emplearse y se seleccionan los machos que presenten una alta agresividad, posteriormente se colocan los machos de la misma cepa de las hembras y estas últimas son retiradas. Entonces los machos de la cepa a estudiar interactúan con los machos agresivos y son muy susceptibles de estresarse por el dominio social que ejerce la otra cepa (Meerlo et al., 1996; Marini et al., 2006).

1.2.4. Estrés por descarga eléctrica

Este método inductor de estrés se basa en usar descargas eléctricas sobre los animales de experimentación. En roedores, la descarga eléctrica se produce por una pequeña red instalada en la base de la caja donde se encuentra el animal; las descargas (en miliamperios) se dan por un aparato externo y en un tiempo constante por cierto período (Swiergel et al., 2007; Swiergel et al., 2008).

1.2.5. Estrés por nado forzado

Este modelo consta de colocar al roedor en un cilindro de ciertas dimensiones con agua; de esta manera el roedor se estresa al intentar nadar y no poder salir a la superficie (Swiergel et al., 2007; Swiergel et al., 2008). Cabe señalar que este modelo se emplea por pocos minutos debido a la posibilidad de que los animales expuestos se ahoguen.

1.2.6. Estrés por privación del sueño

En este modelo se coloca al roedor sobre una pequeña plataforma que se encuentra en la base de un gran recipiente; este último se llena con agua hasta el nivel de la plataforma de tal manera que el roedor no puede moverse con mucha libertad y evita que entre en sueño por el miedo a caer al agua (Singh y Kumar, 2008).

1.2.7. El estrés por inmovilización y sus efectos

El método de estrés por inmovilización es una variante del procedimiento de estrés por restricción; es comúnmente descrito como un rango de restricción de locomoción, aunque no intenta limitar un miembro específico o estructura particular, como cualquier otra técnica de restricción (Buynitsky y Mostofsky, 2009).

La manera de someter a un organismo al estrés por inmovilización involucra confinar al animal de experimentación a un tubo rígido de plástico de forma cilíndrica, bolsas de plástico, cajas de restricción, u otros dispositivos adaptados, lo que la hace una técnica ideal para roedores (Figura 3) (Glavin et al., 1994; Buynitsky y Mostofsky, 2009).

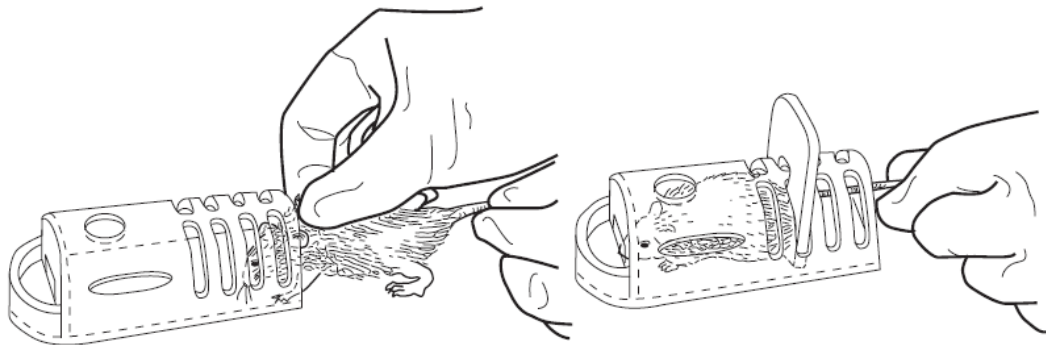


Figura 3. Esquema representativo del modelo de estrés por inmovilización con un dispositivo especial en roedores (Tomado de Donovan y Brown, 2004)

El procedimiento de restricción es una de las técnicas más empleadas para la inducción del estrés experimental, ya que es una técnica fácil y sencilla de usar, además de que el daño físico inducido hacia el animal es mínimo debido al hecho de que no existe un estímulo directo que dañe al animal, tal como las descargas eléctricas empleadas en otros modelos. Cabe destacar que esta técnica, además de inducir un estrés físico, también puede inducir estrés psicológico (Buynitsky y Mostofsky, 2009).

Aunque se puede asumir que el modelo de estrés por inmovilización produce necesariamente una respuesta al estrés (Glavin et al., 1994), en ciertas instancias puede no desencadenarla (Buynitsky y Mostofsky, 2009), dependiendo de la intensidad y duración de la inmovilización.

El efecto del estrés por inmovilización en roedores repercute sobre diversos órganos, pero afecta principalmente al cerebro, propiciando cambios en la conducta, disminuyendo la actividad motora, la memoria espacial y la exploración

de campo abierto (Mamczarz et al., 1999). Por otro lado, también se ha demostrado que este modelo puede inducir el incremento en la secreción de ACTH, corticosterona y prolactina (McGivern et al., 1997; Jaroenporn et al., 2007). Adicionalmente, el estrés por inmovilización ha demostrado que puede inducir daño oxidativo en diversos órganos periféricos, así como en el cerebro (Buynitsky y Mostofsky, 2009), por lo que se ha convertido en un buen modelo para investigar las alteraciones en el balance oxidante/antioxidante (Zaidi y Banu, 2004; Şahin y Gümüşlü, 2007a y b).

1.3. El estrés oxidativo

Cuando existe en los organismos un desbalance entre la formación de ciertos compuestos (llamados radicales libres y especies reactivas del oxígeno y nitrógeno), y los mecanismos que permiten la remoción de estos últimos (cascada antioxidante), se genera un estado llamado estrés oxidativo (Kidd, 2005; Sayre et al., 2008). Este estado resulta ser nocivo para la célula y todo el organismo, quedando implicado en diversas enfermedades.

1.3.1. Las Especies Reactivas del Oxígeno y los Radicales Libres

Todos los organismos aeróbicos tienen la capacidad de oxidar algunos productos y reducir otros; adicionalmente, éstos requieren de una fuente de electrones para reducir el O₂, aunque al llevar a cabo estos procesos se pueden generar agentes oxidantes como las especies reactivas del oxígeno (ERO) y diversos radicales libres, los cuales en exceso pueden resultar dañinos (Roberts et al., 2009; Hansberg-Torres, 2008; Shigenaga et al., 1994).

Las ERO son compuestos de oxígeno que tienen una gran reactividad con otras moléculas. Se consideran ERO al oxígeno atómico (O), al ozono (O₃), al oxígeno singulete (¹O₂), al anión superóxido (O₂^{•-}), al peróxido de hidrógeno y al radical hidroxilo (HO[•]) (Hansberg-Torres, 2008).

Por otro lado, los radicales libres son átomos que contienen un electrón desapareado dentro de su estructura; es decir, la existencia de un electrón que no tiene una pareja con spin opuesto dentro de un átomo o grupo de átomos (Miranda, 2008).

En este punto, hay que tomar en cuenta que algunas ERO son radicales libres por definición; sin embargo, existen algunas que no lo son y pueden incluso tener una mayor reactividad que cualquier otro radical libre.

1.3.1.1. El ozono

La luz ultravioleta y las descargas eléctricas pueden romper los dos enlaces covalentes en la molécula de oxígeno y dar origen a dos átomos de oxígeno; éste a su vez puede interactuar con una molécula de oxígeno molecular y formar el O₃. Aunque esta molécula se genera en la estratósfera, puede llegar a formarse en la superficie terrestre por la descomposición del dióxido de nitrógeno (NO₂[•]). Se sabe que esta ERO puede a su vez interactuar con ácidos nucleicos, proteínas y lípidos, y dar origen al radical hidroxilo (Hansberg-Torres, 2008).

1.3.1.2. El oxígeno singlete

Esta ERO se origina cuando uno de los dos electrones libres del O_2 cambia de giro al captar energía. Las sustancias coloridas que hay en las células (flavinas, porfirinas, retinol, quinonas, pterinas, etc.) pueden excitarse con la luz azul (430 a 490 nm) y con el componente A de la luz ultravioleta (320 a 400 nm), consiguiendo transferir energía de excitación al O_2 y generando oxígeno singlete. La dismutación espontánea del $O_2^{\cdot -}$ también puede generar 1O_2 . El oxígeno singlete reacciona con la mayoría de los componentes celulares, participando de manera importante en la oxidación del ADN (Hansberg-Torres, 2008).

1.3.1.3 El anión superóxido

Cuando el O_2 capta un electrón, éste se puede aparear con uno de los dos electrones libres de los orbitales π y formar así el $O_2^{\cdot -}$, que es a la vez un anión y un radical. Esta ERO se produce principalmente en la cadena respiratoria mitocondrial, siendo el complejo I y III sus sitios de formación. Sin embargo, el anión superóxido también se puede formar de la NADPH oxidasa, el citocromo P_{450} y la xantina oxidoreductasa. El $O_2^{\cdot -}$ es tóxico para la célula, porque a partir de él se puede originar el radical hidroxilo, el cual es más reactivo y daña aún más a los componentes celulares (Hansberg-Torres, 2008; Hall et al., 2010).

1.3.1.4. Peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 se forma cuando uno de los dos electrones libres del O_2 se ha apareado con un electrón de giro contrario. La actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) produce la mayor parte de peróxido de hidrógeno en la célula, ya

que ésta enzima se encarga de transformar el $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 . La toxicidad del peróxido de hidrógeno se debe principalmente a la reacción de algunos metales de transición con los que se produce el radical OH^{\cdot} (Hansberg-Torres, 2008).

1.3.1.5. El radical hidroxilo

Cuando el H_2O_2 acepta un electrón desapareado - por ejemplo, de un metal de transición como el hierro o el cobre -, entonces se fragmenta y forma un ion hidroxilo y el radical hidroxilo (reacción de Fenton). El OH^{\cdot} es uno de los compuestos más reactivos que existen y puede oxidar tanto las purinas como las piridinas, y también la desoxirribosa, reaccionando con cualquier aminoácido y ocasionando daños irreversibles a las proteínas. Los ácidos grasos poli-insaturados son más susceptibles a la oxidación por el radical hidroxilo (Hansberg-Torres, 2008; Hall et al., 2010).

1.3.2. Las especies reactivas del nitrógeno

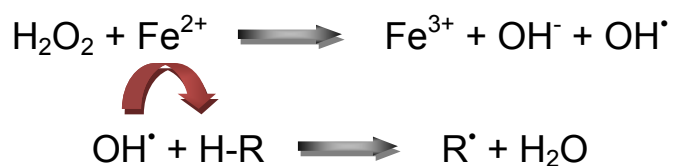
También el oxígeno puede formar otras moléculas reactivas con el nitrógeno, siendo éstas conocidas como especies reactivas del nitrógeno (ERN), y son: el óxido nítrico (NO^{\cdot}), el dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}) y el peroxinitrito ($ONOO^{\cdot}$). Estas moléculas también son muy dañinas para la célula ya que pueden reaccionar con las macromoléculas e interferir con sus funciones (Hansberg-Torres, 2008; Hall et al., 2010).

1.4. Fuentes de ERO

Diversos estudios han descrito cuales son los principales procesos y fuentes de radicales libres y ERO, así como los pasos y fenómenos que permiten su producción.

1.4.1. Reacciones de Fenton y Haber-Weiss

Una de las maneras de producir radicales libres en un organismo vivo es por medio de una de las reacciones de oxidación más comunes, conocida como la reacción de Fenton (ver Reacción 1). La reacción implica la oxidación del Fe^{2+} , uno de los compuestos pro-oxidantes por excelencia, a Fe^{3+} mediada por el peróxido de hidrógeno (Halliwell y Gutteridge, 1984).



Reacción 1. Mecanismo de la reacción de Fenton y el daño que puede ocasionar su producto OH^\bullet .

Esta reacción fragmenta al peróxido en un ion hidróxido y un radical hidroxilo. Este radical es de muy alta energía, y puede oxidar y fragmentar compuestos orgánicos. En principio, el radical hidroxilo reacciona abstrayendo hidrógeno de los compuestos orgánicos y generando radicales alquilo (R^\bullet) que pueden sufrir diferentes reacciones, entre las que destacan su reacción con oxígeno molecular y la generación de peróxidos orgánicos que sufren posteriormente una fragmentación y generan nuevos radicales que llevarán a cabo la completa fragmentación de la molécula (Miranda, 2008).

Otro mecanismo por el cual se pueden generar algunas ERO es mediante la interacción entre el anión superóxido, el peróxido de hidrógeno, radicales hidroxilo y la presencia de algún metal en transición libre (Fe^{2+} o Cu^{1+}) (Haber y Weiss, 1934).



Reacción 2. Mecanismo de la reacción de Haber-Weiss

Esta reacción es conocida como de Haber-Weiss (Reacción 2) y produce anión superóxido, que a su vez puede generar una reacción en cadena que va produciendo más ERO.

1.4.2. Cadena respiratoria mitocondrial

La mitocondria es un organelo muy importante dentro de la célula ya que una de sus funciones es la de generar la energía a través de la molécula de adenosin trifosfato (ATP) (Kidd, 2005). Lo anterior lo realiza a través de la cadena respiratoria mitocondrial que consiste en complejos enzimáticos (I-IV; I: NADH ubiquinona oxidoreductasa o NADH deshidrogenasa, II: succinato ubiquinona oxidoreductasa o succinato deshidrogenasa, III: ubiquinol citocromo c oxidoreductasa, y IV: citocromo c oxidasa), cofactores y la ATP sintetasa (Sas et al., 2007).

La mayor parte del O_2 consumido por la mitocondria es reducido a agua por el complejo IV de la cadena respiratoria. Este mecanismo se da gracias a que este

complejo se encarga de que los e^- provenientes de la cadena utilicen H^+ procedentes de la matriz mitocondrial y se unan al oxígeno singulete para formar agua (Konigsberg-Fainstein, 2008a). Sin embargo, cerca del 1-2% del O_2 no se reduce completamente, lo que genera anión superóxido (Chance et al., 1979).

Debido a que la cadena respiratoria produce la energía para la manutención de la célula, en su proceso de intercambio de electrones se constituye como una de las fuentes más importantes de radicales libres y ERO. Existen electrones desapareados que escapan de los complejos respiratorios, principalmente del complejo I y III, que permite la generación de anión superóxido por la interacción con O_2 (Ames et al., 1993).

Aunque el mecanismo por el cual se da la producción del anión superóxido en el complejo I es poco entendido, se sabe que el ciclo de la ubiquinona tiene un rol importante en la formación del $O_2^{\cdot-}$, lo cual ha sido sugerido en base a los experimentos con inhibidores del complejo I que demuestran que existen dos sitios de formación del anión superóxido: uno relacionado con la ubiquinona y otro con un centro de hierro-azufre (FMN) (Kowaltowsky et al., 2009; Kakkar y Singh, 2007). La formación del anión superóxido en el complejo I ocurre en el lado de la matriz de la membrana interna mitocondrial (Orrenius, 2007; Poyton et al., 2009).

Otros estudios han evidenciado que el complejo II y el succinato tienen una participación destacada en la producción del anión superóxido en el complejo I por vía de la transferencia de electrones reversa del succinato a la ubiquinona

(Kowaltowsky et al., 2009; Orrenius, 2007; Poyton et al., 2009); sin embargo, el mecanismo no es claro aún.

Por otra parte, la producción del $O_2^{\cdot-}$ en el complejo III está mejor documentada. El proceso de formación de esta ERO se da por un flujo de electrones que existe en el ciclo de la ubiquinona, la cual sufre procesos de reducción y oxidación, y estos electrones pueden interactuar con el oxígeno que difunde libremente en el espacio intermembranal de la mitocondria (Kowaltowsky et al., 2009; Orrenius, 2007). Se sabe que la producción del $O_2^{\cdot-}$ puede darse tanto hacia el lado de la matriz como al citosol (espacio intermembranal) de la membrana interna mitocondrial, siendo mayoritaria su producción hacia la matriz (Kakkar y Singh, 2007).

1.4.3. Sintasa del óxido nítrico

El estímulo de los receptores N-metil-D-aspartato (NMDAr) (receptor para aminoácidos excitadores) puede permitir la acumulación de Ca^{2+} intracelular y, en consecuencia, causar la activación de la sintasa del óxido nítrico (NOS), generando NO. La formación del NO se deriva de la capacidad que tiene la NOS de oxidar la L-arginina a L-citrulina (Puddu et al., 2008). Un incremento en la concentración del $O_2^{\cdot-}$ puede interactuar con el NO, permitiendo la formación de un anión muy tóxico, el peroxinitrito ($ONOO^-$) (Sas et al., 2007).

1.4.4. Citocromo P₄₅₀

Existe una superfamilia de enzimas denominadas mono-oxigenasas, las cuales se encargan de oxidar ciertos sustratos (Konigsberg-Fainstein, 2008b). Dentro de

esta superfamilia existe un grupo de enzimas que contienen un grupo hemo como grupo prostético; a este grupo se le conoce como citocromo P₄₅₀ (González, 2005). La función de estas enzimas está involucrada en el metabolismo de los xenobióticos, aunque también se sabe que algunas de estas enzimas también están involucradas en la biosíntesis de esteroides (González, 2005; Konigsberg-Fainstein, 2008b).

Como se mencionó anteriormente, estas enzimas participan en el metabolismo de los xenobióticos, y lo realizan dentro de un sistema denominado monooxigenasas microsomales (MOM), el cual se localiza en la cara externa de la membrana del retículo endoplásmico. Este sistema se conforma de dos isoformas de citocromo P450: la NADPH P₄₅₀ reductasa y la P₄₅₀ (Werck-Reichhart y Fayereisen, 2000).

Básicamente, la razón por la que se forman ERO se debe a que existen procesos de óxido-reducción en esta etapa del proceso de detoxificación de xenobióticos, por lo cual existe fuga de electrones, los cuales pueden interactuar con el oxígeno que se emplea para la oxidación del sustrato y formar así O₂^{•-} y H₂O₂.

1.4.5. NADPH oxidasa

La familia de las NADPH oxidasas, o NOX, son proteínas que transfieren electrones alrededor de las membranas biológicas. Por lo general el NADPH es el donador del electrón y el oxígeno es el aceptor, siendo los productos de la

transferencia de electrones el anión superóxido y el NADP⁺, tal como se muestra en la siguiente reacción (Reacción 3) (Bedard y Krauze, 2007).



Reacción 3. Mecanismo de acción de las NOX

La función biológica de las NOX es la de producir ERO y se encuentran presentes en diversos tejidos y en los fagocitos de los organismos vivos (Bedard y Krauze, 2007; Paravicini y Touyz, 2008).

El complejo enzimático que comprende la NADHP oxidasa se compone de tres subunidades citosólicas (p40_{phox}, p47_{phox} y p67_{phox}), las cuales necesitan ser fosforiladas por una proteína cinasa y unirse con proteínas G pequeñas (Rac 1 y 2) para poder interactuar con las unidades transmembranales (p22_{phox} y gp91_{phox}) (Bedard y Krauze, 2007). La subunidad gp91_{phox} es el centro catalítico de este complejo enzimático y contienen dos grupos hemo en la región amino terminal, un sitio de unión al NADPH y al FAD en la región del carbono terminal, formando un complejo aparato de transporte de electrones del NADPH por la vía de los dos grupos hemo hacia al oxígeno (Sumimoto, 2008).

La función de las NOX en los fagocitos se encuentra bien estudiada. Su desempeño radica en la producción de ERO para inducir un daño oxidativo y, en consecuencia, aniquilar a los agentes patógenos; a este proceso se le conoce como estallido respiratorio o explosión oxidativa (Bedard y Krauze, 2007). Las NOX, al encontrarse en el fagosoma y al ser activadas, inducen la formación del anión superóxido. En consecuencia, este puede inducir la formación de otras ERO

o radicales, como el peróxido de hidrógeno o el radical hidroxilo, el cual es muy peligroso por la alta reactividad hacia las macromoléculas. De esta manera se desarrolla el estallido respiratorio, generando estragos a las bacterias o microorganismos dañinos a la célula (Bedard y Krauze, 2007; Paravicini y Touyz, 2008).

1.4.6. Xantina oxidorreductasa

La xantina oxidorreductasa (XOR) es un miembro de la familia de enzimas que contienen molibdeno como grupo prostético (Kisker et al., 1997). Esta enzima puede interconvertirse en dos formas: en xantina deshidrogenasa (XDh) y xantina oxidasa (XO) (Berry y Hare, 2004). Ambas formas pueden catalizar la conversión de hipoxantina a xantina, y de xantina a ácido úrico (Berry y Hare, 2004), las dos reacciones terminales de la vía de degradación de la purina.

La XOR contiene como cofactores a una molibopterina (Mo-Co), dos centros hierro-azufre y un FAD (Hille y Nishino, 1995). La XO difiere de la XDh en que puede reducir oxígeno, mientras que la XDh reduce mayoritariamente NAD⁺ y minoritariamente oxígeno (Berry y Hare, 2004). La importancia de esta enzima en el estrés oxidativo radica en que puede producir O₂⁻ y H₂O₂ por una serie de pasos de oxidorreducción, en donde puede existir una fuga de electrones al oxidar la hipoxantina a xantina y la xantina a ácido úrico, provocando así la reducción del oxígeno molecular a O₂⁻• (Puddu et al., 2008).

1.5. Peroxidación de lípidos

Durante el estado de estrés oxidativo, las macromoléculas son susceptibles de ser dañadas por las ERO y radicales libres, ya que estos interaccionan con lípidos,

proteínas, ADN y carbohidratos quitándoles electrones, volviéndolos inestables y generando daños por reacción en cadena (Sayre et al., 2008).

De entre las moléculas biológicas, los lípidos son más susceptibles de ser atacadas por ERO y ERN. Se sabe que este daño oxidativo altera las propiedades biológicas de la membrana (estructura, función, permeabilidad, etc.) y genera productos potencialmente tóxicos que pueden dañar proteínas y ADN (Niki, 2008; Valko et al., 2007).

Al proceso de daño oxidativo a lípidos se le conoce como lipoperoxidación o peroxidación de lípidos (LP) (Halliwell y Chirico, 1993). De los ácidos grasos existentes en los organismos, los ácidos grasos poli-insaturados son los más susceptibles al daño por radicales con respecto a los ácidos grasos saturados y mono-insaturados, los cuales son más estables y resistentes al ataque por radicales.

El proceso de la lipoperoxidación se da en tres etapas:

- 1) Iniciación: El comienzo de la peroxidación de lípidos se desarrolla cuando alguna ERO o ERN es lo suficiente reactiva como para abstraer un átomo de hidrógeno del carbono del grupo metilo de la cadena de un lípido (Halliwell y Chirico, 1993). Al efectuarse este mecanismo, el lípido sufre un arreglo molecular formando dienos conjugados, y el carbono que sufrió la pérdida del hidrógeno interacciona con oxígeno molecular, formando un radical denominado peroxilo ($\text{ROO}\cdot$) (Zenteno y Saldaña, 2008).

- 2) Propagación: El ROO• necesita de un electrón para estabilizarse. Al estar juntos, los ácidos grasos poli-insaturados en cualquier membrana, el radical abstrae un átomo de hidrógeno del carbono del grupo metilo del lípido adyacente, lo cual propicia que el nuevo lípido dañado reorganice su estructura con dienos conjugados y forme un radical peroxilo; este proceso genera una reacción en cadena a lo largo de la membrana y daña las estructuras de los lípidos (Halliwell y Chirico 1993; Zenteno y Saldaña, 2008).
- 3) Término: Este mecanismo puede ser finalizado cuando el ROO• interactúa con otro radical (ROO•) o un antioxidante que pueda estabilizarlo (ascorbato o α -tocoferol), de tal manera que no afecte al lípido adyacente (Zenteno y Saldaña, 2008).

Al observar los procesos que se dan durante la lipoperoxidación, uno se puede dar cuenta de que es esta es dañina para la célula al generar un daño sobre la estructura, función y permeabilidad de la membrana, dando pie a que se alteren otras funciones vitales, incluso comprometiendo la sobrevivencia de ésta. Durante este proceso, se pueden generar productos que pueden ser tóxicos para la célula, dos de éstos son el malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), los cuales se sabe pueden ser mutagénicos (Valko et al., 2007; Ogino y Wang, 2007).

1.6. Mecanismos antioxidantes

La formación de ERO/ERN y radicales libres en el organismo es natural, siempre y cuando ocurra en bajas concentraciones. Estas especies desempeñan funciones

como señalización y protección contra microorganismos; sin embargo, cuando las concentraciones de ERO/ERN son altas, se desencadena un proceso de estrés oxidativo, el cual, como ya hemos mencionado, puede inducir un daño celular (lipoperoxidación, daño a ADN, daño a proteínas, etc.). Ante los procesos de daño oxidativo, el organismo cuenta con defensas antioxidantes que evitan el daño y pueden estabilizar aquellas ERO que son más reactivas. Este mecanismo se divide en dos tipos: los no enzimáticos (glutati3n reducido, 3cido asc3rbico y α -tocoferol) y los enzim3ticos (super3xido dismutasa, glutati3n peroxidasa y catalasa) (Mat3s y S3nchez-Jim3nez, 1999).

1.6.1. Super3xido dismutasa

La super3xido dismutasa (SOD) es una enzima que se encarga de llevar a cabo la reducci3n del ani3n super3xido a per3xido de hidr3geno para que este 3ltimo en su momento pueda ser catalizado a agua por la glutati3n peroxidasa (GPx) o catalasa (CAT) (Mat3s y S3nchez-Jim3nez, 1999).



Reacci3n 4. Mecanismo de acci3n de la SOD.

Esta enzima puede presentarse en tres isoformas en las c3lulas de los mam3feros, y dependiendo del lugar donde se encuentren ser3n sus caracter3sticas. La primera de estas tres isoformas es la cobre/zinc super3xido dismutasa (Cu/Zn-SOD) o SOD 1 (denominada as3 en el humano), y se encuentra en la regi3n citos3lica de la c3lula, fracciones lisosomales, e incluso puede ubicarse en el espacio intermembranal de la mitocondria. Aunque realiza la misma

reacción, se caracteriza por ser un homodímero de 64 kDa con un centro catalítico en cada subunidad compuesta por un cobre y zinc (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999; Warner et al., 2004; Ho et al., 1998; Okado-Matsumoto y Fridovich, 2001). Otra de estas isoformas es la denominada manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD) o SOD 2, la cual es un homotetrámero de 96 kDa que contiene un átomo de manganeso por cada subunidad y se encuentra en la matriz mitocondrial (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999; Warner et al., 2004). Esta enzima es muy importante debido a que es la primera en actuar ante la formación del $O_2^{\cdot-}$ en la cadena respiratoria mitocondrial (Guan et al., 1998).

Finalmente, la última de estas enzimas es la superóxido dismutasa extracelular (EC-SOD) o SOD 3. Esta enzima tiene en su centro catalítico un átomo de Cu y uno de Zn; sin embargo, se diferencia de la Cu/Zn-SOD en que es homotetramérica y contiene en su estructura una glucoproteína, ubicándose en el espacio extracelular de los tejidos, plasma, linfa y fluidos sinoviales (Adachi y Wang, 1998; Matés y Sánchez-Jiménez, 1999).

1.6.2. Glutati3n reducido

Una mol3cula que es empleada en los mecanismos antioxidantes, tanto enzimáticos como no enzimáticos, es el glutati3n (Figura 4). Esta mol3cula es un trip3ptido compuesto de glutamato, glicina y ciste3na (Warner et al., 2004). Y es sintetizado por la enzima llamada γ -glutamilciste3na sintetasa (Fern3ndez-Checa y Garc3a-Ru3z, 2008).

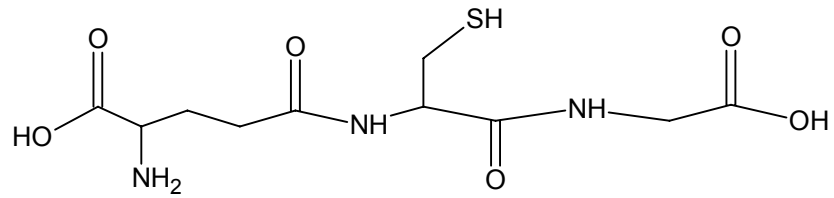


Figura 4. Estructura del glutatión reducido

El glutatión es denominado reducido (GSH) dada la presencia de grupos sulfhídricos de la cisteína, los cuales pueden oxidarse formando un puente disulfuro con otro glutatión (Figura 5), formando así un compuesto denominado glutatión oxidado (GSSG) (Warner et al., 2004).

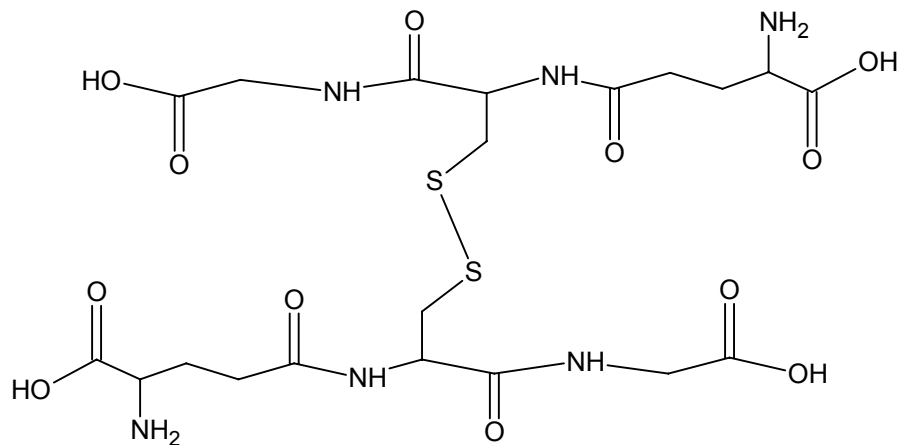


Figura 5. Estructura del glutatión oxidado

El GSH participa en mecanismos antioxidantes enzimáticos como cofactor de la GPx. Como se mencionó previamente, la GPx lleva a cabo la catálisis de peróxido de hidrógeno a agua, ayudándose del GSH (Reacción 5).



Reacción 5. Mecanismo de acción de la GPx

La GPx es un homotetrámero (80 kDa) miembro de la familia de las peroxididasas que contiene en su centro catalítico de cada subunidad un residuo de selenocisteína. Como integrante de la familia de las peroxididasas puede catalizar la reducción de varias hidropoxididasas, incluyendo al peróxido de hidrógeno (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999).

Tal y como lo muestra la reacción, se emplean dos moléculas de GSH para obtener una de GSSG, lo cual se debe, como lo mencionamos anteriormente, a que los GSH, por medio de sus grupos sulfhídricos de la cisteína, dona sus hidrógenos en la reacción y forma un conjugado por medio de un puente disulfuro, lo que da lugar a una sola molécula de GSSG (Warner et al., 2004).

Para reducir el GSSG a GSH, es necesaria la enzima glutatión reductasa (GR), la cual requiere de NADPH como cofactor; de esta manera se obtienen dos moléculas de GSH a partir de una de GSSG (Figura 6) (Kakkar y Singh, 2007). La GR es una flavoproteína homodimérica de un peso de 51 kDa por cada subunidad, y es dependiente de NADPH (Fernández-Checa y García-Ruiz, 2008).



Figura 6. Mecanismo de acción del GSH, GPx y GR. Tomado de Kakkar y Singh, 2007.

Sin embargo, el GSH no solo actúa como cofactor de la enzima GPX, pues también puede actuar como un mecanismo antioxidante no enzimático (no

necesita de una maquinaria enzimática para llevar a cabo una reacción) en donde esta molécula interactúa con radicales libres para poder estabilizarlos (Fernández-Checa y García-Ruiz, 2008).

1.6.3. Catalasa

La catalasa (CAT) es una enzima homotetramérica con un peso de 60 kDa por cada subunidad, y está asociada a un grupo hemo (Matés y Sánchez-Jiménez, 1999). Esta enzima lleva a cabo la reducción del peróxido de hidrógeno a agua, tal y como la muestra la siguiente reacción:



Reacción 6. Mecanismo de acción de la catalasa sobre el H₂O₂.

Sin embargo, también tiene una actividad de peroxidasa (Reacción 7):



Reacción 7. Mecanismo de acción de la catalasa como peroxidasa.

A diferencia de la GPx, la CAT no necesita del glutatión como cofactor y actúa cuando los niveles de peróxido de hidrógeno son muy altos, participando sólo como una respuesta adaptativa al estrés oxidativo, mientras que la GPX es la que actúa en condiciones normales (Hunt et al., 1998; Peraza-Reyes, 2008).

1.7. El estrés oxidativo en el cerebro en modelos de estrés por inmovilización

El sistema nervioso central (SNC) es particularmente una de las regiones más vulnerables al daño oxidativo debido a la alta proporción de O₂ que emplea, a la relativamente baja concentración de antioxidantes y enzimas relacionadas, y al alto contenido de lípidos poli-insaturados, que son las macromoléculas más susceptibles a la oxidación (Sayre et al., 2008). Se calcula que el cerebro emplea alrededor del 20% de toda la energía que se produce en un organismo (Papa, 1996).

En los últimos 25 años se han realizado diversos estudios sobre el efecto que tiene el estrés como inductor de daño oxidativo en el cerebro y su posible relación con el desarrollo de enfermedades neurológicas y neurodegenerativas. Las investigaciones que se han enfocado en modelos de estrés agudo como inductor de daño oxidativo en roedores en el cerebro son resumidas en la siguiente tabla, en las que se muestra el tipo de estrés, el tiempo de exposición, los marcadores de estrés oxidativo evaluados, el efecto sobre defensas antioxidantes, el área cerebral estudiada y la referencia:

Tabla 1. Efectos del estrés agudo en marcadores de estrés oxidativo en regiones cerebrales de distintos modelos en roedores

Especie	Modelo de estrés	Duración	Marcador	Defensa Antioxidante	Región cerebral	Referencia
<i>Rata</i>	Inmovilización	30 min.	↓Lipoperoxidación		Cerebro completo	(Kovacs et al., 1996)
	Inmovilización por frío	2 h		↓Cu/Zn-SOD y CAT	Hipocampo	(Pajovic et al., 2005)
	Inmovilización	2 h		= Mn-SOD y Cu/Zn SOD; ↓CAT	Hipocampo	(Pajovic et al., 2005)
	Restricción	6 h	↑Lipoperoxidación	↓GSH, SOD, CAT y GST	Cerebro completo	(Zaidi y Banu, 2004)
	Inmovilización	6 h	↑NOS _i , COX-2 ↑Lipoperoxidación	↓GSH	Corteza cerebral	(Madrigal et al., 2003)
	Inmovilización	8 h	↑Lipoperoxidación, daño a proteínas y ADN		Corteza cerebral, cerebelo, hipocampo y mesencéfalo	(Liu et al., 1996; Radak et al., 2001)
	Restricción	1 y 4 h	↑ Lipoperoxidación	↓ GSH, GPx y GR	Hipocampo, corteza y estriado	(Atif et al., 2008)
<i>Ratón</i>	Inmovilización	6 h	↑ Lipoperoxidación	↓ GSH y CAT	Cerebro completo	(Goyal y Anil, 2007; Kumar y Goyal, 2007; Kumar et al., 2009)
	Privación del sueño	72 h	↑ Lipoperoxidación	↓ GSH	Cerebro completo	(Singh y Kumar, 2008)

↓: Disminución en la actividad de enzimas o niveles de GSH, ↑: Aumento en la actividad de enzimas o niveles de GSH, =: Sin cambio en la actividad de enzimas o niveles de GSH. GST: Glutación-S-transferasa, NOS: Óxido nítrico sintasa, COX-2: Ciclooxygenasa 2. Modificado de Pardon, 2007.

Como se mencionó previamente, el mecanismo por el cual el estrés genera daño oxidativo no es muy claro; sin embargo, se cree que se debe a la alta demanda metabólica y energética, lo que podría inducir un aumento en los niveles de ERO (Pardon, 2007).

1.8. L-carnitina

La L-carnitina (trimetilamino-β-hidroxi-butirato) es un compuesto de amonio cuaternario (Figura 7), de bajo peso molecular obtenido del consumo de carne y alimentos (75 %). También es sintetizada a partir de los aminoácidos esenciales L-lisina y L-metionina (25%), siendo el hígado y los riñones los sitios de mayor producción. La L-carnitina es biológicamente activa en su isoforma L (Hoppel, 2003; Anusuya et al, 2006; Virmani y Binienda, 2004) y se presenta en las células y en el tejido como carnitina libre o como acilcarnitinas, incluyendo a la acetil-L-carnitina (ALC).

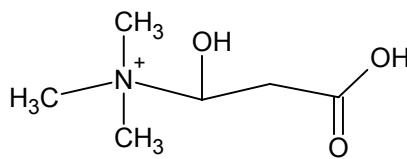


Figura 7. Estructura química de la L-carnitina.

1.8.1. El rol fisiológico de la L-carnitina

El papel fisiológico de la L-carnitina (L-CAR) consiste en ser cofactor en el transporte de ácido grasos para su conversión en energía por la β-oxidación (Figura 8). Interviene facilitando la oxidación de los ácidos grasos y actuando como un cofactor en el transporte de grupos acil grasos hacia la membrana interna mitocondrial, realizando la función de remover los grupos acil grasos tóxicos de la mitocondria (Savitha y Panneerselvam, 2006).

La activación de los ácidos grasos para formar acil-Coenzima A (acil-CoA) ocurre en las fracciones microsomales del retículo endoplasmático y en la

superficie de la cara exterior de la membrana externa mitocondrial, en donde la acil-CoA atraviesa la membrana hacia el espacio intermembranal de la mitocondria por medio de un canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) (Kerner y Hoppel, 2000).

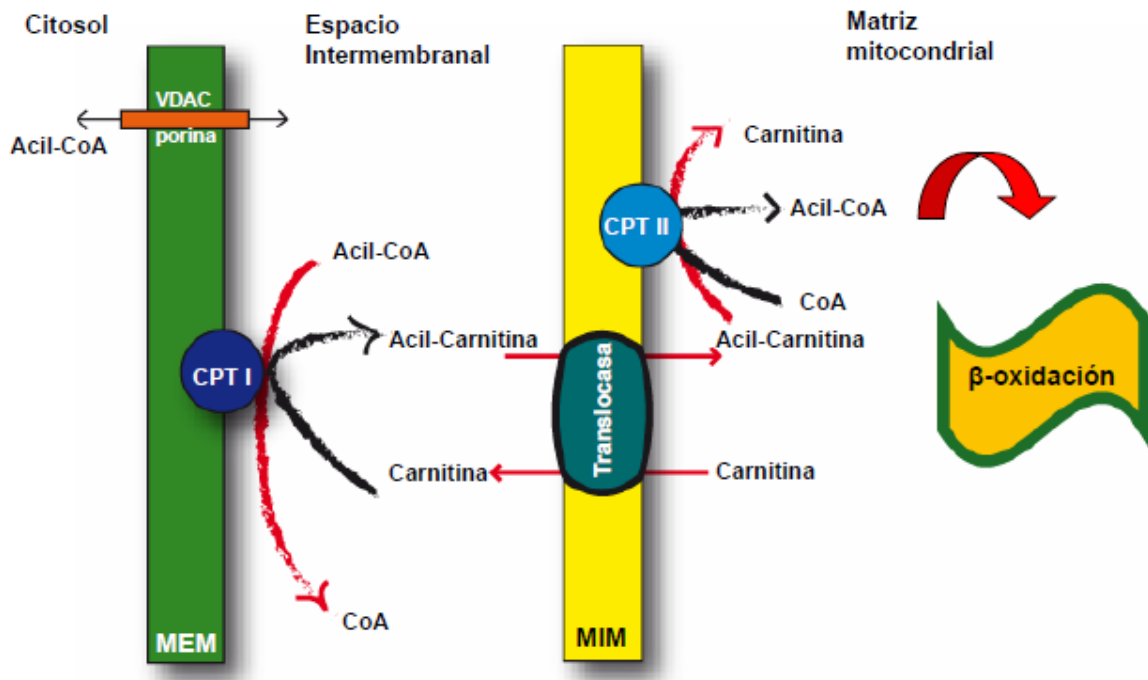


Figura 8. Papel de la L-carnitina como molécula pro-energética. CPT 1: carnitina palmitoiltransferasa 1, CPT 2: carnitina palmitoiltransferasa 2, Translocasa: acilcarnitina translocasa, MEM: membrana externa mitocondrial, MIM: membrana mitocondrial interna.

Bajo condiciones normales, la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT 1) cataliza la transferencia de grupos acil de la molécula acil-CoA a la carnitina para producir acilcarnitinas y Coenzima A libre (CoA) (Jones et al., 2010). Por otro lado, la carnitina acetiltransferasa (C-AT) cataliza la síntesis de la acilcarnitinas de cadenas cortas, específicamente la ALC, y está ubicada en la membrana mitocondrial interna. Consecuentemente, las acilcarnitinas son transportadas al

otro lado de la membrana interna mitocondrial por la acílcarnitina translocasa, un importante sitio de regulación del contenido de carnitina intramitocondrial (Hoppel, 2003). Dentro de la matriz, la acetil carnitina actúa como sustrato para la carnitina palmitoiltransferasa II (CPT-II), la cual transfiere el grupo acil a una CoA y libera la carnitina (Hoppel, 2003; Jones et al., 2010). Finalmente el grupo acil entra a la β -oxidación.

1.8.2. La L-carnitina como antioxidante

Se sabe que las concentraciones de cartinina en el cerebro son bajas con respecto a los demás tejidos periféricos (Jones et al., 2010), por lo que su estudio en patologías relacionadas con su deficiencias exaltan la importancia de esta molécula. Es por ello que se han realizado estudios sobre sus posibles efectos sobre el daño neuronal.

La funciones protectoras de la L-carnitina sobre el daño oxidativo en las células han sido ampliamente estudiadas, aunque los mecanismos por los cuales actúa aún no se han comprendido muy bien. Ciertas investigaciones han establecido que la L-carnitina tiene una capacidad antioxidante y antirradical al demostrar que puede reducir el efecto quelante del ion hierro y secuestrar ERO como el $O_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 (Gülçin, 2006). Paradies y colaboradores (1994) han reportado que la ALC tiene un efecto protector en la actividad de los complejos enzimáticos citocromo oxidasa y adenina nucleótido translocasa en la mitocondria del corazón de ratas ancianas, mejorando su desempeño. Posteriormente, este mismo grupo evaluó el efecto de la acetil-L-carnitina sobre el transportador de piruvato y la oxidación en

las mitocondrias del corazón de ratas envejecidas, encontrando que restaura la tasa de su función metabólica al nivel que tienen las ratas jóvenes (Paradies et al., 1999). El suministro de ALC en la dieta de ratas ancianas ha tendido un efecto positivo al revertir los efectos degenerativos en la actividad mitocondrial propia de la senectud en las células hepáticas, restaurando los niveles de cardiolipina y la actividad ambulatoria (Hagen et al., 1998); además, la administración de ALC junto con ácido lipóico ha demostrado tener buenos resultados al disminuir el estrés oxidativo (Hagen et al., 2002). La administración de L-CAR junto con el ácido DL- α -lipóico tiende a evitar, en gran medida, el daño macromolecular inducido por la oxidación en varias regiones del cerebro (Anusuya et al., 2006), mejora la condición de la membrana mitocondrial en el corazón de ratas longevas (Savitha y Panneerselvam, 2006) y revierte el efecto de decrecimiento del GSH en músculo esquelético y corazón de ratas longevas. Otro efecto que ha demostrado tener la L-CAR es la de evitar la apoptosis en células neuronales, como han demostrado Ishii y colaboradores (2000). Se ha relacionado este efecto neuroprotector a su capacidad antioxidante al evitar un daño oxidativo en el DNA y RNA en varias regiones del cerebro de ratas envejecidas, evitando así una posterior fragmentación del material genético (Juliet et al., 2005), así como por su habilidad para regular la actividad de las caspasas por medio de la vía del ligando FAS (Mutomba et al., 2000). Adicionalmente, en un trabajo previo que se ha realizado en este laboratorio (Silva-Adaya et al., 2008) se encontró que la L-carnitina previene el estrés oxidativo inducido por la actividad sinérgica de dos toxinas

(ácido quinolínico y ácido 3-nitropropiónico), demostrando su actividad antioxidante en pruebas de modelos neurotóxicos.

1.9. Diazepam

El diazepam (7-cloro-1,3-dihidro-1-metil-5-fenil-2H-1,4-benzodiazepin-2-ona) es un fármaco que pertenece al grupo de las benzodiazepinas (BDZ) (Figura 9) y es ampliamente usado para tratar la ansiedad, epilepsia, intoxicación y supresión alcohólicas, tensión muscular y ciertas enfermedades neurológicas (Jiménez-Velásquez et al., 2008).

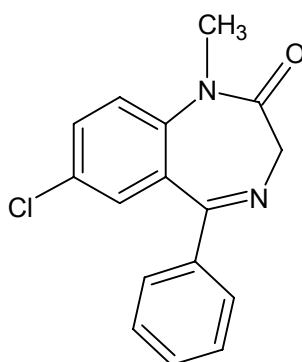


Figura 9. Estructura química del diazepam.

1.9.1. Mecanismo de acción del diazepam

El ácido-γ-amino butírico (GABA) es el neurotransmisor inhibitorio más importante en el cerebro de los mamíferos y es esta transmisión la que se ve alterada en la epilepsia, ansiedad y otros desórdenes psiquiátricos (Heiss y Herholz, 2006). Se conocen dos tipos de receptores de GABA: los receptores de GABA tipo A (GABA_A) que son ionotrópicos, y los tipo B (GABA_B) que son

metabotrópicos (Sivilotti y Nistri, 1991). Sin embargo, existe un tipo de receptores GABA denominados de tipo C, los cuales se encuentran en la retina (Costa et al., 2002). Hoy en día se sabe que la estructura de los receptores de GABA_A se puede componer de 16 subunidades (α 1- α 6, β 1-3, γ 1- γ 3, δ , ϵ , π y θ) (Sieghart y Sperck, 2002), aunque algunos autores sugieren la existencia de otra subunidad β -4 (Costa et al., 2002). Estas subunidades se ensamblan formando un pentámero con una estructura definida formada por dos tipos iguales de subunidad α , dos tipos iguales de subunidades β y una subunidad de γ , δ , ϵ , π o θ , dando origen al receptor de GABA_A (Whiting, 2006). Tal como se puede esperar, existe una gran variedad de tipos de GABA_A, dependiendo de las subunidades que lo conforman.

Las BDZ son agonistas de estos receptores de GABA_A, potenciando la actividad de GABA, y los receptores que contienen a las subunidades γ 2 y γ 3 dentro de sus estructuras tienen el sitio de unión a las BDZ, siendo que sólo las combinaciones de subunidades α 1 β x γ 2, α 2 β x γ 2, α 3 β x γ 2 y α 5 β x γ 2 (donde x es cualquier tipo de subunidad β) tienen una alta afinidad por las BDZ clásicas como el diazepam (DZ), lorazepan y clonazepan (Whiting, 2006; Sivilotti y Nistri, 1991).

Al interactuar alguna BDZ, como el DZ, con el sitio de unión a los receptores GABA_A, se induce la activación del receptor, permitiendo un cambio conformacional que permite la entrada de cloro (Cl⁻) en la neurona a través del receptor (Figura 10), actuando como un canal (Costa et al., 2002). La entrada de cloro permite la hiperpolarización de la membrana, propiciando que la respuesta excitatoria de una neurona sea inhibida (Sivilotti y Nistri, 1991).

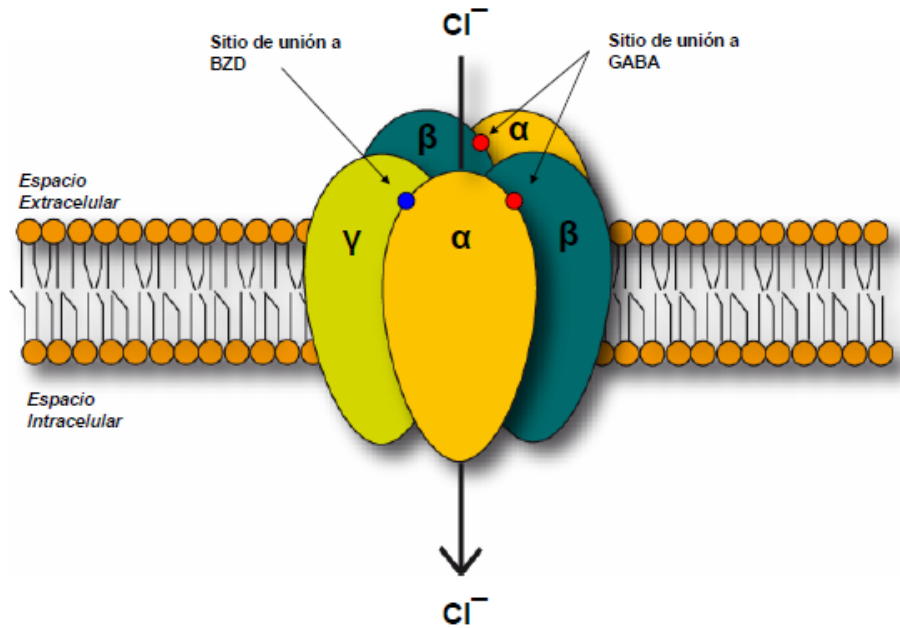


Figura 10. Mecanismo de acción de las BDZ sobre los receptores GABA_A.

1.9.2. El efecto antioxidante/pro-oxidante del diazepam

Aunque el mecanismo por el cual el DZ actúa es conocido, se han comenzado a realizar estudios sobre su posible efecto neuroprotector en modelos de isquemia en gerbos y ratas, gracias a su capacidad de mejorar la neurotransmisión GABAérgica (Schwartz et al., 1994; Schwartz et al., 1995); en algunos estudios se ha observado que este fármaco reduce la temperatura cerebral, disminuye significativamente la muerte celular en el área CA1 del hipocampo y mejora su conducta en pruebas de campo abierto (Dowden et al., 1999). Igualmente, se ha encontrado que puede disminuir la formación de óxido nítrico y la peroxidación lipídica, y mejorar la actividad de enzimas antioxidantes en un modelo de epilepsia que induce estrés oxidativo en ratas (Rajasekaran, 2005). No obstante, existen investigaciones que, aunque concuerdan con los trabajos de Dowden

(1999) sobre la reducción de muerte celular en CA1, evidencian que el DZ no ejerce neuroprotección durante períodos prolongados de isquemia (Davies et al., 2004), contribuyendo además a la generación de radicales libres (Musavi y Kakkar, 1998). Adicionalmente se ha visto que después de una repetida administración de DZ, su retirada abrupta genera disminución en enzimas antioxidantes (Musavi y Kakkar, 2000).

2. JUSTIFICACIÓN

El estrés está implicado en diversas enfermedades, tanto neurológicas, como psiquiátricas. Debido a la alta incidencia de trastornos relacionados al estrés y la ansiedad, resulta importante conocer si existe una susceptibilidad regional cerebral al daño oxidativo inducido por el estrés.

Por otro lado el tratamiento actual de los trastornos de estrés y ansiedad está basado casi de forma exclusiva en el uso de ansiolíticos (generalmente benzodiazepinas) e inhibidores en la recaptura de serotonina. Sin embargo, los efectos de estos fármacos sobre el daño tisular y celular ejercido por el estrés aun son inciertos. Hasta el momento ningún tratamiento neuroprotector es utilizado en el manejo de estos trastornos.

Adicionalmente, es de gran interés conocer si el daño oxidativo inducido por el estrés puede verse modificado con el uso de antioxidantes y comparar sus efectos con la administración de un ansiolítico típico como el diazepam.

3. HIPÓTESIS

La exposición de las ratas a una inmovilización por 24 hrs ocasionará un aumento en los niveles de la peroxidación lipídica, acompañado de una disminución en la funcionalidad mitocondrial, en la actividad de la superóxido dismutasa y en los niveles de GSH en las fracciones sinaptosomales y homogenados de las distintas regiones cerebrales a estudiar (hipotálamo, estriado, hipocampo y corteza cerebral). Por otro lado, la L-carnitina y el diazepam disminuirían los efectos del estrés sobre estos marcadores a través de la disminución del daño oxidativo. Finalmente, los niveles de corticosterona en el plasma se verán elevados en los animales sometidos a estrés, mientras que los animales tratados con estos fármacos no se verán afectados.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar los efectos que tiene el modelo de estrés por inmovilización en rata por 24 hrs sobre distintos marcadores de daño oxidativo en las fracciones sinaptosomales y homogenados de cuatro regiones cerebrales diferentes (hipotálamo, estriado, hipocampo y corteza prefrontal), así como conocer y comparar los efectos que el antioxidante L-carnitina y el ansiolítico diazepam ejercen como posibles agentes neuroprotectores en este paradigma.

4.2. Objetivos particulares

- Evaluar el daño oxidativo en el modelo de inmovilización a través de los niveles de peroxidación lipídica en las fracciones sinaptosomales de las regiones a estudiar.
- Evaluar la alteración del metabolismo energético en el modelo de inmovilización a través de la funcionalidad mitocondrial en las fracciones sinaptosomales de las regiones a estudiar.
- Conocer los efectos del modelo de inmovilización sobre la actividad de la enzima superóxido dismutasa de los homogenados de las regiones a estudiar.
- Conocer los efectos del modelo de inmovilización sobre los niveles de glutatión reducido de los homogenados de las regiones a estudiar.
- Caracterizar el efecto de la previa administración de la L-carnitina sobre los marcadores de daño oxidativo mencionados previamente.

- Definir el efecto de la previa administración del diazepam sobre los marcadores de daño oxidativo mencionados previamente.
- Evaluar los niveles de corticosterona en los distintos grupos a estudiar para conocer si se generó un efecto estresante.

5. MÉTODO

5.1. Reactivos

El ácido thiobarbitúrico (TBA), el malondialdehído (MDA), el MTT, el o-ftalaldehído (OPA) y la SOD se obtuvieron de Sigma-Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). La L-carnitina se obtuvo de Sigma-Tau (Pomezia, Rome, Italy). El Diazepam - Valium 10 – fue obtenido de Roche Químicos y Farmacéuticos S.A. (Rio de Janeiro, Brasil, Reg. No. 62019 SSA II). El resto de los reactivos fueron proporcionados por otras fuentes comerciales. La determinación de Corticosterona en suero se realizó usando el Corticosterone EIA Kit de Oxford Biomedical Research (Oxford, MI, USA). La determinación de la actividad de la SOD en homogenados y sinaptosomas se realizó usando el SOD determination Kit 19160 (Fluka, St. Louis, MO, USA).

5.2. Animales de experimentación

Los animales se manejaron de acuerdo a los criterios establecidos por la “Guía para el cuidado y uso adecuado de los animales del laboratorio”. Para el desarrollo de la investigación se emplearon un total de 36 ratas machos de la cepa Wistar, con un peso de entre 320-380 g, todas ellas provenientes del bioterio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía. Se alojaron 5 animales por caja y se mantuvieron en el mismo cuarto donde se realizó el protocolo de inmovilización desde dos días antes del inicio del experimento como habituación; así mismo, se mantuvieron bajo condiciones constantes de temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$), humedad ($50 \pm 10\%$), y ciclos de luz/oscuridad (12:12hrs). Antes de la

manipulación experimental, los animales tuvieron libre acceso a alimento y agua (Laboratory rodent diet 5001, PMI Feeds Inc. Richmond, IN, USA).

5.3. Procedimiento de inducción de estrés por inmovilización y administración de fármacos

Los animales de experimentación fueron divididos en 6 grupos con 6 animales cada uno. En el grupo de estrés se realizó la inmovilización durante 24 hrs por medio de un dispositivo de restricción individual del movimiento hecho de plexiglas fenestrado (Modelo: 544-RR, Flat Bottom Restrainer 3.25" X 8". Plas Labs Inc. Lansing Minnesota, U.S.A.), el cual permite la inmovilización de roedores de forma no traumática y es ajustable para animales de entre 250-500 g de peso. Adicionalmente, durante la inmovilización los animales fueron privados de alimento y agua. El grupo control y los grupos de tratamiento sin estrés no fueron sometidos a inmovilización, pero permanecieron en las mismas condiciones de aislamiento y restricción que los animales inmovilizados (cada rata en una caja individual con privación de agua y alimento durante 24 hrs). Las dosis administradas fueron para L-CAR de 300 mg/kg, y para DZ de 1 mg/kg. Estas dosis fueron administradas por vía intraperitoneal (I.P.) en dosis única a los 20 minutos antes del aislamiento o la inmovilización, según correspondiera. Al terminar la inmovilización se anestesió a los animales con pentobarbital sódico (50mg/Kg I.P.) y se realizó la extracción de 4-5 ml de sangre por punción cardíaca para después realizar la perfusión usando solución salina al 0.9 % (200-250 ml). Las muestras de sangre total fueron centrifugadas durante 10 minutos a 3,800 x *g*, y se obtuvo el suero que fue almacenado a -70°C hasta su utilización para la determinación de corticosterona.

Al final de la perfusión, se extrajo el cerebro, se disecaron las distintas regiones cerebrales de interés (hipocampo, hipotálamo, cuerpo estriado y corteza prefrontal), y se procedió a la obtención de las preparaciones biológicas (homogenados o sinaptosomas). Para los ensayos de peroxidación lipídica y funcionalidad mitocondrial, se decidió emplear sinaptosomas por ser estructuras enriquecidas en membrana y mitocondrias, mientras que para la medición de la actividad de la SOD y los niveles de GSH se usaron homogenados de las distintas regiones obtenidas con la finalidad de contar con una preparación más integral del sistema celular. Cabe destacar que para la realización de la determinación de los niveles de GSH se empleó otro conjunto de 6 animales por los 6 grupos, los cuáles se mantuvieron bajo las mismas condiciones y se realizaron los mismos procedimientos previamente descritos.

5.4. Homogenados y fracciones sinaptosomales

Las fracciones sinaptosomales se obtuvieron a partir de cada una de las regiones cerebrales mediante centrifugaciones diferenciales en gradientes crecientes de sacarosa, según lo reportado con anterioridad (Santamaría et al., 2003; Silva-Adaya et al., 2008). Brevemente, el procedimiento fue el siguiente: las regiones cerebrales se preservaron transitoriamente en hielo y fueron homogenizadas en 10 volúmenes (p/v) de sacarosa (0.32 mol/L). Durante este paso se obtuvo el volumen necesario para realizar las pruebas para determinar la actividad de SOD. Posteriormente, para obtener los sinaptosomas, el homogenado fue centrifugado a $1,073 \times g$ durante 10 minutos, y el sobrenadante fue recentrifugado a $17,172 \times g$ durante 15 min. El pellet resultante fue suavemente

resuspendido en 1.3 mL de buffer-HEPES (NaCl 0,1mol/L, NaH₂PO₄ 0.01 mol/L, NaHCO₃ 0.05 mol/L, CaCl₂ 0.01 mol/L, glucosa 0.006 mol/L, HEPES 0.01 mol/L, pH 7.4). Las fracciones sinaptosomales obtenidas fueron utilizadas en fresco para los siguientes ensayos.

5.5. Ensayo de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica fue estimada en cada región del cerebro a través del método espectrofotométrico de determinación de sustancias reactivas al TBA, usando una curva estándar para MDA, según lo reportado previamente (Santamaría et al., 1999; Pérez-De La Cruz et al., 2006; Silva-Adaya et al., 2008). Brevemente, el proceso fue el siguiente: se tomaron alícuotas de 250 µL de los sinaptosomas, se mezclaron con 250 µL de buffer-HEPES y 500 µL de reactivo TBA (0.75 g TBA + 15 g de ácido tricloroacético + 2.54 mL HCl), y se incubaron en agua a 94°C durante 20 minutos. Posteriormente, las muestras se enfriaron en hielo durante 5 minutos y más tarde fueron centrifugadas a 3,000 x *g* por 15 min. La densidad óptica del sobrenadante fue medida en un espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 8 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) a una longitud onda de 532 nm. La concentración final de TBARS (principalmente MDA) fue calculada a través de la interpolación con una curva estándar de MDA, y corregida según el contenido de proteína de cada muestra. Los resultados se expresaron en porcentaje de formación de sustancias reactivas al TBA con respecto de los valores control. Los cálculos fueron corregidos por el contenido de proteína de acuerdo al método de Lowry (1951). Los valores de los seis individuos de cada grupo fueron obtenidos.

5.6. Ensayo de la funcionalidad mitocondrial por MTT

La viabilidad mitocondrial en las distintas regiones se evaluó mediante el ensayo de reducción de (MTT), como una aproximación parcial a la funcionalidad de la cadena respiratoria y la función mitocondrial, usando el método reportado con anterioridad (Berridge y Tan, 1993; Mosmann, 1983; Silva-Adaya et al., 2008). Se emplearon alícuotas de 400 μ L de fracciones sinaptosomales, que se incubaron con 8 μ L de MTT (5 mg/ml) durante 60 minutos a 37°C. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 15,300 x *g* durante 3 minutos, se eliminó el sobrenadante y el pellet fue suavemente resuspendido en 500 μ L de isopropanol ácido. La nueva suspensión se recentrifugó a 1,700 x *g* durante 2 minutos más, y finalmente, la cantidad de formazán se determinó midiendo la absorbancia del sobrenadante a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 8 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). Los resultados fueron expresados en porcentaje de reducción de MTT con respecto a los valores control. Datos de los seis individuos de cada grupo fueron obtenidos y promediados.

5.7. Determinación de la actividad de la SOD

La determinación de la actividad de la SOD en homogenados se realizó usando el kit comercial SOD determination Kit 19160 (Fluka, St. Louis, MO, USA). Brevemente, el ensayo se basa en el empleo de una sal de tetrazolio altamente soluble en agua (2-(4-Iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfophenyl)-2H-tetrazolium, sal monosódica), la cual produce un formazán soluble en agua en

respuesta a la reducción de una molécula de anión superóxido. La proporción de reducción del O_2 es linealmente relacionada con la actividad de la XO y es inhibida por la actividad de la SOD, siendo ésta la manera en que se puede determinar su actividad por método colorimétrico. El formazán así formado fue medido usando un espectrofotómetro ThermoSpectronic Genesys 8 (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA) a una longitud de onda de 450 nm. Los datos se expresaron como porcentaje de actividad de la SOD (proporción de inhibición) con respecto al control.

5.8. Determinación de los niveles de GSH

Los niveles de GSH se midieron usando un método previamente descrito (Hissin y Hilf, 1976; Galván-Arzate et al., 2005). Para esta técnica se empleó el tejido de las regiones directamente y se homogenizaron en 3.75 mL de buffer EDTA-fosfato (pH 8.0) más 1 mL de HPO_3 (25 %). Posteriormente, el homogenado se centrifugó a 3,000 x *g* por 15 minutos y el sobrenadante fue separado. Subsecuentemente, usando 500 μ L del sobrenadante, se agregaron 4.5 mL del buffer EDTA-fosfato, a 100 μ L de esta dilución se añadieron 1.8 ml de buffer, posteriormente se adicionaron 100 μ L de *o*-phthalaldehído (OPA). La mezcla fue incubada a temperatura ambiente durante 15 minutos y la cuantificación de GSH fue calculada midiendo la señal fluorescente, usando un espectrofotómetro luminiscente (Perkin-Elmer LS 55), usando una longitud de onda de 350 nm de excitación y 420 nm de emisión. Los datos se corrigieron según el contenido de proteína en la muestra, de acuerdo al método de Lowry (1951) y se expresaron en μ g de GSH por mg de proteína.

5.9. Determinación de los niveles de corticosterona

La sangre recolectada del corazón de los diferentes grupos de animales se centrifugó a 3,800 x *g* por 10 minutos, el suero se recolectó y guardó a -70°C hasta su empleo. Los niveles de corticosterona se cuantificaron empleando el kit comercial Corticosterone EIA Kit de Oxford Biomedical Research EA66 (Oxford, MI, USA). Brevemente, el ensayo se basa en la competencia que existe entre el conjugado enzimático y la corticosterona contenida en la muestra por un número limitado de sitios de unión en los anticuerpos que se encuentran recubriendo la placa. Primero se agrega la muestra de suero a la placa, después se agrega el conjugado diluido de la enzima, se agita e incuba durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se realiza un lavado para eliminar lo que no se haya unido a la placa y se agrega un sustrato para evidenciar el contenido de la enzima en la placa. La reacción de la enzima y el sustrato producen un cromóforo a los 30 minutos que puede ser cuantificado midiendo la absorbancia a 650 nm de longitud de onda y extrapolándola en una curva estándar. La intensidad de color en la muestra es inversamente proporcional al contenido de corticosterona presente en la muestra. La concentración final de corticosterona es expresada en ng/mL.

5.10. Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como valores promedio \pm error estándar de la media (E.E.M.). Los datos se analizaron usando análisis de varianza simple de una vía, seguido de una prueba de Tukey para comparación entre promedios,

usando del software Prism 4 (GraphPad, San Diego, Ca, USA). Los valores de $P < 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

5.11 Diagrama de flujo metodológico

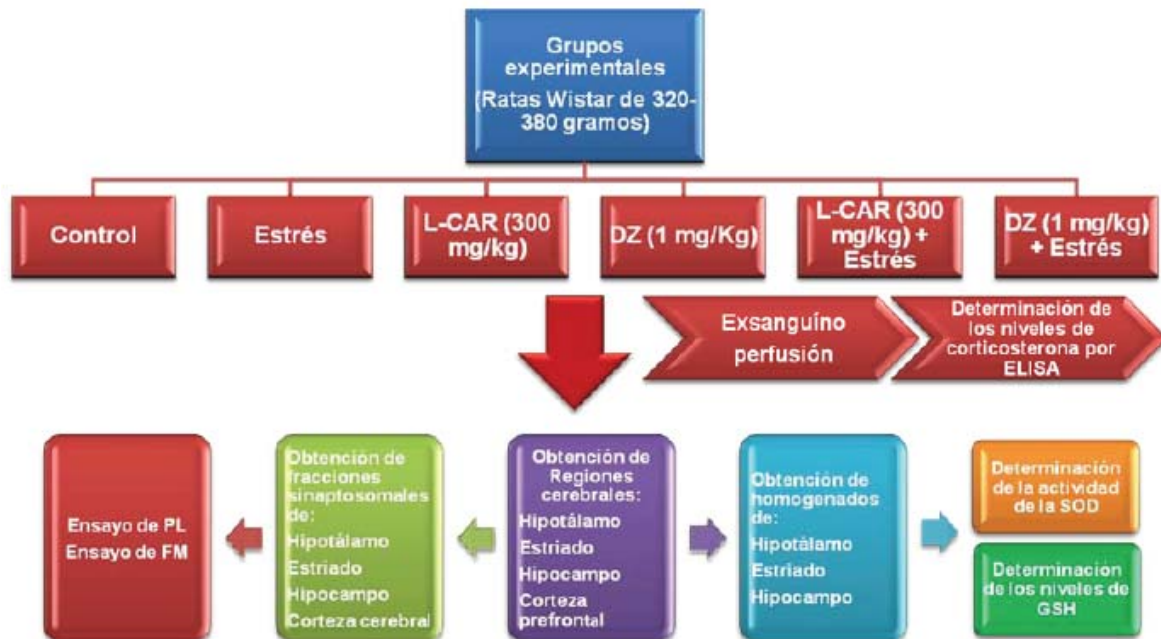
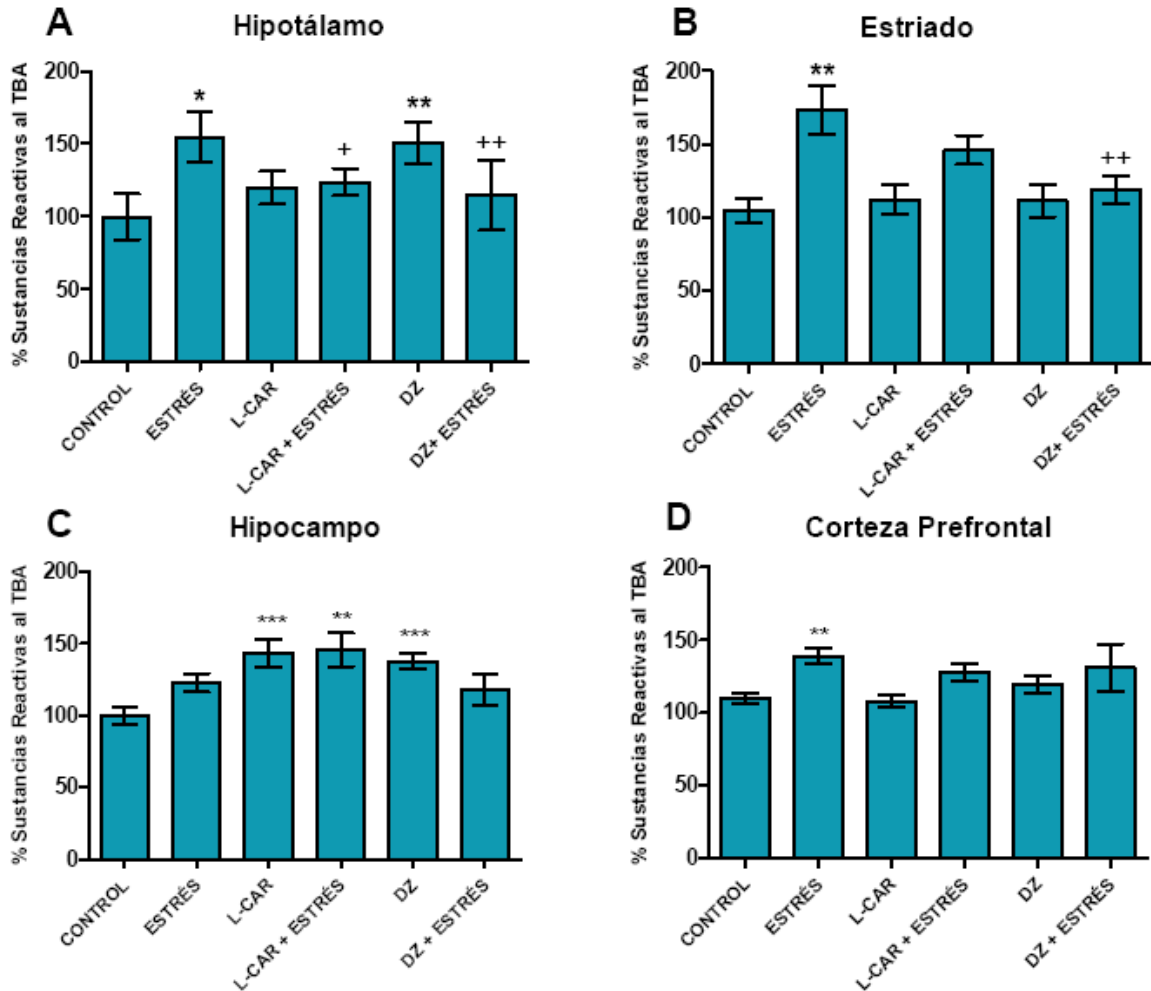


Figura 11. Resumen metodológico del protocolo y ensayos llevados a cabo en el trabajo.

6. RESULTADOS

6.1. Niveles de peroxidación lipídica

La determinación de PL en las cuatro regiones cerebrales estudiadas es mostrada en la Gráfica 1. El estrés agudo por inmovilización incrementó de manera significativa los porcentajes de PL con respecto al control en el hipotálamo ($P < 0.001$, Gráfica 1A), estriado ($P < 0.01$, Gráfica 1B) y en la corteza prefrontal ($P < 0.05$, Gráfica 1D); sin embargo, no se observó diferencia significativa en el hipocampo (Gráfica 1C). La administración aislada de L-CAR no generó cambios significativos en la PL con respecto al control en ninguna de las regiones, a excepción del hipocampo, en la que se observó un incremento significativo de la PL con respecto al control ($P < 0.05$, Gráfica 1C). Por su parte, la administración aislada de DZ provocó un aumento significativo en la PL en el hipotálamo ($P < 0.01$, Gráfica 1A) e hipocampo (Gráfica 1C, $P < 0.05$), pero no se observaron cambios en estriado ni corteza prefrontal. El tratamiento con L-CAR y DZ en ratas estresadas disminuyó significativamente los niveles de PL en comparación con el grupo de estrés ($P < 0.01$ y $P < 0.05$, respectivamente) en el hipotálamo (Gráfica 1A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de PL entre el grupo de estrés y los grupos de estrés tratados con DZ ó L-CAR en estriado, corteza prefrontal e hipocampo (Gráfica B, C y D).



Gráfica 1. Efectos de la L-CAR y el DZ sobre los niveles de PL inducidos por estrés por inmovilización (x 24 h) en sinaptosomas de diferentes regiones del cerebro de rata. La LP fue estimada como porcentaje de formación de sustancias reactivas al TBA con respecto al control en hipotálamo (A), estriado (B), hipocampo (C) y corteza cerebral (D). Los valores presentados corresponden a una n=6 por grupo, y se representan como promedios \pm E.E.M. * $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.05$, diferentes con respecto al control; + $P < 0.01$ y ++ $P < 0.05$, diferentes con respecto al estrés. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

6.2. Funcionalidad mitocondrial

Los resultados del ensayo de función mitocondrial (FM) se muestran en la Tabla 2. El ensayo de funcionalidad mitocondrial realizado en las 4 regiones en los 6 grupos se muestra como el porcentaje de reducción del MTT con respecto al

grupo control. Los resultados muestran que solo a nivel del estriado existe una disminución significativa de la funcionalidad mitocondrial con respecto al control ($P<0.05$). Por otro lado, solo en el hipocampo se observó que el pretratamiento con DZ fue capaz de inducir una recuperación significativa en los niveles de reducción de MTT con respecto al grupo control ($P<0.05$).

Tabla 2. Efectos de la L-CAR y el DZ sobre la disminución en la FM inducida por el estrés por inmovilización (x 24 h) en sinaptosomas de diferentes regiones cerebrales en rata.

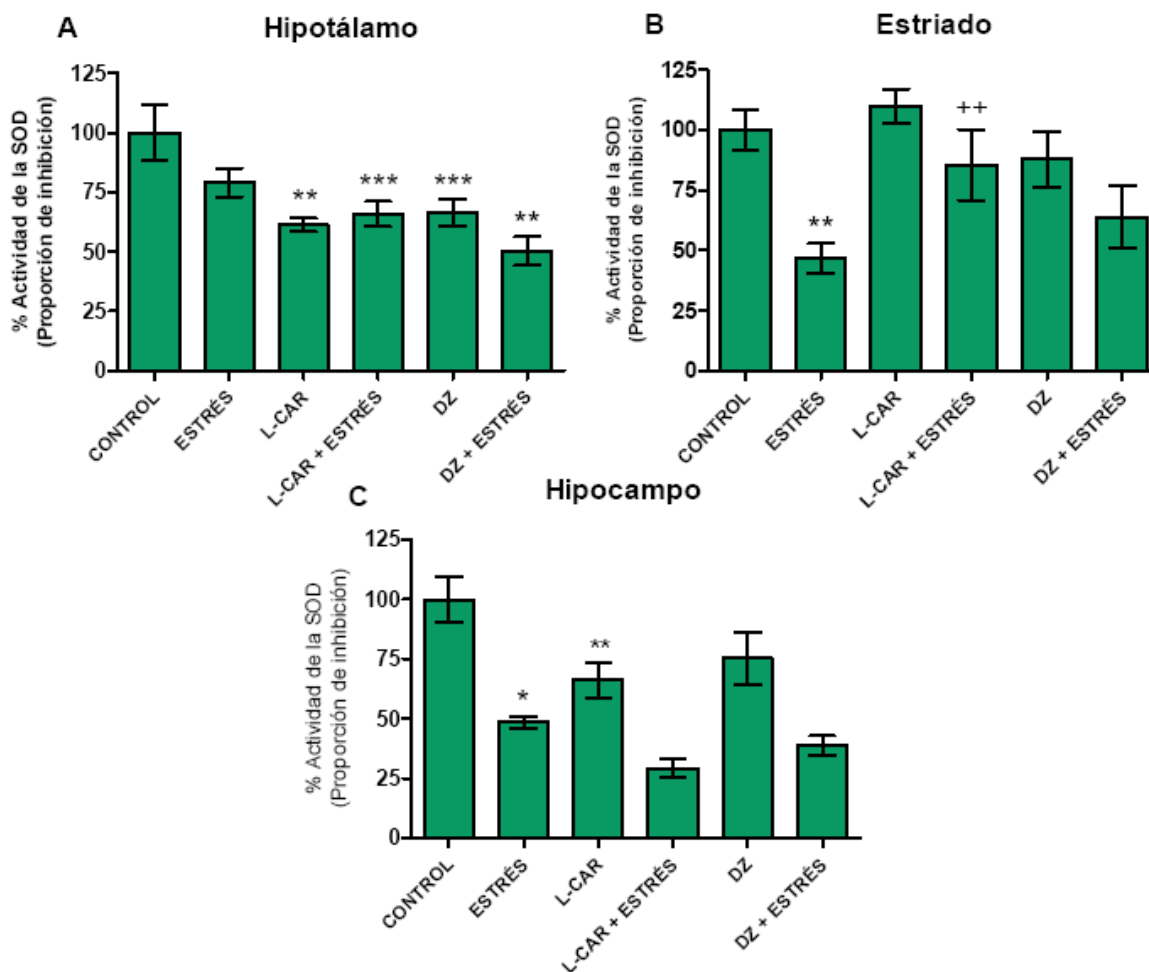
Región	Control	Estrés	L-CAR	DZ	L-CAR + Estrés	DZ + Estrés
Hipotálamo	100±15.02	83.01±19.97	88.39±19.65	101.46±17.54	89.67±43.52	52.18±23.74
Estriado	100±16.90	65.61±9.10*	96.18±6.65	73.14±12.18	85.70±6.32	83.36±31.23
Hipocampo	100±23.10	83.01±10.23	88.39±21.22	101.46±20.55	89.67±10.54	52.18±13.68 *
Corteza prefrontal	100±16.69	93.98±14.24	104.51±12.75	103.80±26.99	114.53±19.91	91.45±9.83

La funcionalidad mitocondrial es expresada como porcentaje de reducción de MTT con respecto al control. Los valores presentados corresponden a una n=6 por grupo y se representan como promedios ± E.E.M. * $P<0.001$, diferente con respecto al control. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

Los resultados mostrados en la corteza prefrontal en los análisis de PL y la FM mostraron pocos cambios asociados al estrés por inmovilización aguda, por lo que para la determinación de la actividad de la SOD y los niveles de GSH, esta región fue descartada en lo sucesivo.

6.3. Actividad de la SOD

La actividad de la SOD (dada por su capacidad de inhibición) en homogenados de las diferentes regiones es mostrada en la Gráfica 2. La condición de estrés disminuyó de manera significativa la actividad enzimática de la SOD en hipocampo ($P < 0.001$, Gráfica 2C) y estriado ($P < 0.05$, Gráfica 2B); sin embargo, en el hipotálamo no se observan cambios en la actividad de SOD con el estrés agudo (Gráfica 2A). La administración aislada de L-CAR y DZ mostró una disminución significativa de la actividad de SOD con respecto al control en hipotálamo (L-CAR a $P < 0.01$ y DZ a $P < 0.05$, Gráfica 2A) e hipocampo (L-CAR a $P < 0.01$, Gráfica 2C). Solo en el estriado la L-CAR demostró recuperar significativamente la actividad de la SOD en los animales sometidos a estrés ($P < 0.05$, Gráfica 2B). En las otras dos regiones se observó inclusive una estimulación de la reducción de la actividad de SOD en los animales sometidos a estrés que recibieron L-CAR o DZ (Gráfica 2A y C).



Gráfica 2. Efectos de la L-CAR y el DZ sobre la actividad de la SOD inducida por el estrés por inmovilización (x 24 h) en homogenados de diferentes regiones del cerebro de rata. La actividad de la SOD se presenta como porcentaje con respecto del control en base a su proporción de inhibición en homogenados de hipotálamo (A), estriado (B) e hipocampo (C). Los valores corresponden a una n=6 por grupo y se representan como promedios \pm E.E.M. * $P < 0.001$, ** $P < 0.01$ y *** $P < 0.05$, diferentes con respecto al control. ++ $P < 0.05$, diferente con respecto al estrés. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba del Tukey.

6.4. Niveles de GSH

Los niveles de GSH en los diferentes grupos y regiones se presentan en la Tabla 3. Como se puede observar, en el estriado no se generó ningún cambio significativo entre los diferentes grupos. En el hipocampo, el estrés disminuyó los niveles de GSH significativamente ($P < 0.001$) con respecto al control.

Adicionalmente, se observó que los tratamientos con L-CAR y DZ en grupos control y en los sometidos a estrés, generaron una disminución significativa con respecto al control ($P < 0.05$) en los niveles de GSH en hipotálamo e hipocampo.

Tabla 3. Efectos de la L-CAR y el DZ sobre los niveles de GSH inducidos por el estrés por inmovilización (x 24 h) en homogenados de diferentes regiones cerebrales en rata.

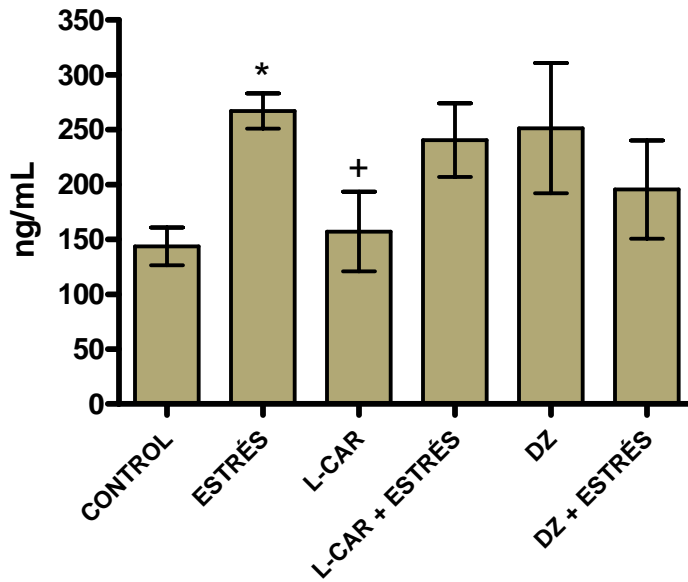
Región	Control	Estrés	L-CAR	DZ	L-CAR + Estrés	DZ + Estrés
Hipotálamo	2.18±1.06	2.27±0.24	1.06±0.14 ^{***} , +	1.14±0.15 ^{***} , ++	1.69±0.15	1.26±0.17 ^{***} , ++
Estriado	1.33±0.21	1.39±0.30	1.32±0.12	1.09±0.18	1.26±0.05	1.63±0.66
Hipocampo	1.51±0.08	1.19±0.06 [*]	1.30±0.22 ^{***}	1.24±0.06 ^{***}	1.29±0.07 ^{**}	1.17±0.10 [*]

Los niveles de GSH son expresados en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de proteína. Los valores presentados corresponden a $n=6$ por grupo y se presentan como promedios \pm E.E.M. $^*P < 0.001$, $^{**}P < 0.01$ y $^{***}P < 0.05$, diferentes con respecto al control; $^+P < 0.01$ y $^{++}P < 0.05$, diferentes con respecto al estrés. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía seguido de una prueba de Tukey.

6.5. Niveles de corticosterona

Los niveles de corticosterona en suero se determinaron al término del período de inmovilización en todos los grupos, y son presentados en la Gráfica 3. Se observó un incremento significativo de esta molécula en el grupo de animales estresados con respecto al control ($P < 0.05$). Los grupos tratados con L-CAR y DZ, y posteriormente sometidos a estrés, no mostraron diferencias significativas en los niveles de corticosterona con respecto a los animales inmovilizados.

Niveles de corticosterona



Gráfica 3. Efecto de la L-CAR y el DZ sobre los niveles séricos de corticosterona inducidos por el estrés por inmovilización (x 24 h) en ratas. Los niveles de corticosterona están presentados como ng/ml. Los valores mostrados corresponden a una n=6 por grupo y se representan como promedios \pm E.E.M. * $P < 0.001$, diferente con respecto al control; + $P < 0.01$, diferente con respecto al estrés. Se realizó un ANOVA de una vía seguido de una prueba del Tukey.

7. DISCUSIÓN

El estrés es definido como una condición externa o interna que perturba la homeostasis biológica y la psicología del individuo (Selye, 1936). El estrés desencadena una serie de respuestas orgánicas orientadas al restablecimiento de la homeostasis, y estas respuestas a su vez preparan al organismo para generar reacciones adaptativas de combate o huida en situaciones de peligro (McEwen, 2007). Las dos vías efectoras más importantes de estas reacciones adaptativas son el sistema simpático-adrenomedular - que media la secreción rápida de catecolaminas a través del sistema nervioso autónomo -, y el eje neuroendocrino HPA - que termina por incrementar los niveles sanguíneos de cortisol en el ser humano, o la corticosterona en el caso de los roedores - (Esch et al., 2002). Sin embargo, aunque las respuestas al estrés tienen una finalidad homeostática, existe amplia evidencia que apoya que, bajo ciertas circunstancias, estas respuestas orgánicas pueden resultar deletéreas para el organismo, sobre todo cuando se trata de respuestas estresantes severas o de larga duración (Sapolski, 1996). Los estresores o estímulos que generan estrés son muy diversos en su origen y modo de acción, y éstos pueden ser de origen interno o externo, físico o psicológico, etc. Recientemente, se ha despertado un gran interés por elucidar el papel que puede tener el estrés en el origen y progresión de diversos trastornos y enfermedades tanto sistémicas como neurológicas y psiquiátricas (Esch et al., 2002). Se ha sugerido que el estrés ambiental puede estar relacionado con el desarrollo de enfermedades crónicas como las neurodegenerativas (Esch et al., 2002). Más aún, a nivel mundial se ha reportado un incremento en la incidencia

tanto de trastornos psiquiátricos, como de enfermedades neurodegenerativas, y se ha sugerido que la exposición crónica a estresores podría jugar un papel importante en el incremento de estos trastornos, sobre todo en los habitantes de las grandes ciudades (Kondo, 1996; Kessler et al., 2005). Es por ésto que resulta de vital importancia el conocimiento más preciso de la relación que existe entre los daños orgánicos ocasionados por el estrés y el desarrollo de las distintas enfermedades a las que se ha asociado, lo que a su vez permitirá realizar aproximaciones terapéuticas más precoces y eficaces para su manejo y prevención.

Distintos modelos experimentales han sido utilizados en el laboratorio con la finalidad de estudiar los procesos biológicos involucrados en las respuestas al estrés (Anisman y Matheson, 2005). El estrés por inmovilización en roedores es considerado un buen modelo de estrés tanto psicológico como físico, y consiste en la privación no traumática del movimiento en los animales de experimentación, generalmente ratas y ratones, utilizando múltiples dispositivos (Buynitsky y Mostofsky 2009; Glavin et al., 1994). Reportes previos han evidenciado que se trata de un buen modelo para estudiar las alteraciones en el balance oxidante/antioxidante en distintos órganos y tejidos (Şahin y Gümüşlü, 2007a; Zaidi y Banu, 2004). Otros estudios han demostrado que el estrés por inmovilización aguda en ratas genera un aumento en la PL, una reducción de la actividad de la SOD (en sus dos isoformas) y una disminución del GSH, aunque las regiones cerebrales y los tiempos de restricción aguda varían en los diferentes

estudios (Liu y colaboradores (1996): 8 horas; Atif et al. (2008): 1 y 4 horas; Zaidi y Banu (2004): 6 horas; Madrigal et al. (2003): 6 horas).

En el presente estudio, el estrés por inmovilización aguda (x 24 horas) en ratas demostró incrementar el porcentaje de PL (medido por la técnica de TBARs en sinaptosomas) con respecto al control en hipotálamo, estriado y corteza prefrontal, aunque no se observaron cambios en el hipocampo. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Atif y cols. (2008), quienes observaron un incremento en los niveles de PL (medidos mediante la técnica de TBARs) en homogenados ricos en mitocondrias de hipocampo, estriado y corteza frontal, tanto a los 60 minutos como a las 4 horas post-inmovilización. Sin embargo, estos resultados difieren de lo encontrado en este trabajo, debido a que a 24 horas de restricción no observamos incremento en la PL en el hipocampo. En el estudio llevado a cabo por Liu y cols. (1996), realizado con inmovilización aguda durante 8 horas, se observó un incremento en los niveles de PL medidos a través de los niveles de MDA en 4 regiones cerebrales (corteza, mesencéfalo, cerebelo e hipocampo), pero a diferencia de nuestros resultados, estos autores no observaron cambios significativos en estriado, hipotálamo (como ocurrió en nuestro caso) ni tallo cerebral caudal. En un estudio similar se reportó un incremento en los niveles de PL en el hipocampo después de 8 horas de restricción de movimiento (Radak et al., 2001). Todos estos estudios muestran aparentemente un efecto diferencial del estrés oxidativo generado por inmovilización aguda sobre las diversas regiones cerebrales; sin embargo, hay que considerar que existen variables metodológicas entre los estudios, tales como la duración de la inmovilización, el dispositivo

utilizado para la inmovilización, la preparación biológica empleada en las determinaciones, etc., que en su conjunto hacen difícil una comparación rigurosa entre los estudios. Sin embargo, algunos estudios han demostrado que las diversas regiones cerebrales difieren en su capacidad antioxidante y en su susceptibilidad al daño oxidativo. En un estudio usando ratones de 3 meses de edad se observaron altos niveles de 8-hidroxi-2-desoxiguanosina en mesencéfalo, caudado-putamen e hipocampo, mientras que el cerebelo, la corteza y el tallo cerebral caudal generaron niveles menores de este mismo marcador (Cardoso-Peláez et al., 2000). Otros estudios sobre la capacidad antioxidante de distintas regiones cerebrales en ratas envejecidas han corroborado estas diferencias (Siqueira et al., 2005). Estas observaciones pueden explicar al menos en parte de las diferenciales regionales de PL encontradas en los estudios de estrés agudo.

Los mecanismos que se encuentran mediando el daño celular ocasionado por estrés ambiental no se conocen por completo, pero hasta ahora se han implicado factores de transcripción como el NF- κ B activados mediante receptores de catecolaminas (Bierhaus et al., 2003), el acortamiento de los telómeros cromosómicos y la disminución de la actividad de las telomerasas (Epel et al., 2004), etc. En el caso del tejido nervioso, existe amplia evidencia sobre la toxicidad celular ocasionada por glucocorticoides (McEwen, 1999), y se ha demostrado que el estrés puede incrementar los niveles de aminoácidos excitadores a nivel extracelular, lo cual puede predisponer al desarrollo de excitotoxicidad (Lowy et al., 1995; Liu et al., 1996). Por otro lado, se sugiere que el incremento en la tasa metabólica generada como respuesta adaptativa al estrés

puede también incrementar la generación de especies reactivas a partir de la cadena respiratoria mitocondrial, generando estrés oxidativo y daño a macromoléculas por peroxidación lipídica (Pardon, 2007; Liu et al., 1996; Psarra y Sekeris, 2009).

En nuestro estudio, la administración aislada del antioxidante bifuncional L-CAR no generó cambios en los niveles de PL con respecto al control, excepto en el hipocampo en el que se observó un incremento significativo de la PL. Este efecto aparentemente paradójico de este antioxidante en condiciones basales ha sido ya reportado con anterioridad. En el estudio de Alves y colaboradores (2009), la administración aislada de Acetil-L-Carnitina (ALCAR) a animales control generó un aumento en los niveles de MDA en mitocondrias aisladas de cerebro total de rata (Alves et al., 2009). Así mismo, existen reportes de este efecto pro-oxidante con ALCAR en tejidos no neuronales como el hígado (Hagen et al., 2002) y en estudios *in vitro* (Yasui et al., 2002). Se especula que este efecto puede estar ocasionado por las propiedades pro-energéticas de la L-CAR, la cual al incrementar el transporte de ácidos grasos hacia la β -oxidación, puede al menos en teoría incrementar el metabolismo energético, y por ende la producción de radicales libres en la cadena de transporte de electrones mitocondrial (Yasui et al., 2002). Es importante destacar que además existe evidencia de efectos biológicos pro-oxidantes para otros antioxidantes como el ácido α -lipóico (Moini et al., 2002), la vitamina A (de Oliveira et al., 2007a; de Oliveira et al., 2007b, de Oliveira et al., 2008) y la vitamina C (Carr y Frei, 1999).

En nuestro estudio, en los animales sometidos a estrés, la administración de L-CAR redujo de manera significativa la PL inducida por estrés agudo en el hipotálamo; sin embargo, en las otras dos regiones que demostraron incremento en la PL (estriado y corteza prefrontal) no se demostró efecto significativo de la L-CAR. Lo encontrado en el hipotálamo coincide con lo observado en otros estudios, en los que se demuestra protección de la L-CAR sobre el estrés oxidante asociado a otras condiciones como el envejecimiento en ratas (Anusuya et al, 2006, Long et al., 2009, Savitha et al., 2005; Arockia-Rani y Panneerselvam, 2002). Sin embargo, la falta de efecto protector de la L-CAR sobre la PL en las otras regiones puede sugerir un efecto diferencial quizá basado en la biodisponibilidad de la L-CAR en estas regiones o a la susceptibilidad particular de estas regiones al estrés oxidativo.

El DZ, en nuestros experimentos, demostró también ejercer efectos ambivalentes: por un lado pro-oxidantes, cuando fue administrado de forma aislada en ratas no estresadas en la región del hipocampo e hipotálamo, y por otro lado mostró efectos protectores sobre la PL en hipotálamo y estriado en las ratas sometidas a estrés agudo. Ambos tipos de efectos han sido reportados con anterioridad. En diversos estudios se ha demostrado que la administración única de DZ es capaz de inducir estrés oxidativo con incremento en los niveles de peroxidación de lípidos en homogenados de distintas regiones de cerebro, fracciones mitocondriales de cerebro de rata, e incluso en hepatocitos (Musavi y Kakkar, 1998; 2003; El-Sokkary, 2008, Nirmal et al., 2008, Castro et al., 2009). El mecanismo mediante el cual el DZ induce estrés oxidativo se conoce muy poco,

pero se ha sugerido que la acción del DZ sobre otro tipo de receptores de BZD no asociados al receptor GABA - denominados receptores periféricos de BDZ (PBzR) que se encuentran en las fracciones subcelulares mitocondriales y nucleares, y cuya función parece estar involucrada en el metabolismo oxidativo y flujo de iones - puede jugar un papel importante en la generación de estrés oxidativo (Musavi y Kakkar, 1998;2000;2003). La selectividad regional del DZ para ejercer sus efectos pro-oxidantes o protectores observada en nuestro estudio ya ha sido reportada con anterioridad (Musavi y Kakkar, 2003; Castro et al., 2009), aunque aún no se conocen las bases de la heterogeneidad regional de sus efectos, e incluso existen estudios que no han demostrado en absoluto efectos pro-oxidantes del DZ en homogenizados de cerebro completo (Matsumoto et al., 1999). Es posible que la distribución cerebral regional de los PBzR tenga relación con estos efectos diferenciales. En un estudio de neuroimagen funcional usando radioligandos para el PBzR se demostró una distribución diferencial de estos receptores en sujetos sanos, siendo más alta en el tálamo y más baja en el estriado, lo cual puede explicar en parte la falta de efecto oxidante del DZ en esta última estructura (Miyoshi et al., 2009).

Por otra parte, los efectos protectores del DZ sobre el estrés oxidativo inducido por estrés han sido observados y discutidos con anterioridad. Reportes previos demuestran que la modulación de los receptores a GABA a través de distintos fármacos agonistas del receptor de BDZ reduce el daño oxidativo generado por estrés por inmovilización aguda (Kumar y Goyal, 2007; Goyal y Anil, 2007; Kumar et al., 2009) y por estrés psicológico (Matsumoto et al., 1999; Singh y Kumar,

2008). Aunque el mecanismo por el que ocurre esta protección no se conoce con precisión, se ha sugerido que el DZ al incrementar la transmisión GABAérgica disminuye la transmisión excitatoria glutamatérgica, disminuyendo así su posible efecto excitotóxico.

En cuanto a los resultados observados en la funcionalidad mitocondrial mediante el ensayo de reducción de MTT, no se observaron cambios significativos con el estrés por inmovilización aguda, solamente se observó una reducción de la funcionalidad en el estriado en animales estresados y una recuperación de la funcionalidad en el hipocampo en el grupo de estrés tratado con DZ. Esta falta de alteración de la funcionalidad mitocondrial puede deberse a que el estrés por inmovilización aguda (x 24 hrs) fue capaz de generar daño oxidativo a nivel de lípidos de una forma región-dependiente, aunque quizá este daño oxidativo no fue lo suficientemente severo como para comprometer la funcionalidad mitocondrial de una forma significativa. En este sentido, estudios con inmovilización crónica (21 días) si han podido demostrar alteraciones de la actividad de los complejos enzimáticos de la cadena respiratoria mitocondrial a partir de la primer semana (Madrigal et al., 2001), lo que sugiere que nuestro modelo fue moderado.

Por otra parte, nuestros resultados mostraron que el estrés por inmovilización aguda disminuye de forma significativa la actividad de la SOD total en homogenados del estriado e hipocampo, pero no se observaron cambios en el hipotálamo. En estudios previos ya se ha establecido que el estrés disminuye de manera significativa la actividad y expresión de la SOD (Zaidi y Banu, 2004; Şahin y Gümüşlü, 2007a y b; Zaidi et al., 2003; Filipović y Pajović, 2009). No obstante es

importante destacar que en nuestros resultados la administración aislada de L-CAR o DZ provocó también una disminución en la actividad de SOD en hipotálamo e hipocampo de animales control, y solo se observó una recuperación de la actividad de la misma en el estriado en el grupo sometido a estrés y tratado con L-CAR. El efecto deletéreo de la L-CAR sobre la actividad de SOD ya ha sido reportado con anterioridad en un estudio de estrés por inmovilización crónica tanto en retina como en cerebro completo (Derin et al., 2006), aunque existen otros estudios que no han encontrado ningún efecto de la L-CAR sobre la actividad de SOD en grupos control (Barhwal et al., 2009; Anusuya et al., 2006). De la misma forma, para el DZ existe evidencia que demuestra que la actividad de la SOD puede verse disminuida con una dosis de DZ en tejido cerebral y en hepatocitos (Musavi y Kakkar, 1998 y 2003; El-Sokkary, 2008; Nirmal et al., 2008). Interesantemente, algunos estudios no demuestran alteración de la actividad de SOD con el uso de DZ en varias regiones cerebrales (Castro et al., 2009). Para explicar esta divergencia de efectos biológicos de los fármacos empleados, tienen que considerarse distintas variables metodológicas entre los estudios, como son la edad de los animales, la preparación biológica o fracción celular analizada, la dosis empleada de los fármacos, las regiones analizadas, etc. Todas estas variables pueden estar influyendo en la respuesta final del sistema nervioso a los fármacos probados.

En lo que respecta a los niveles de GSH, está ampliamente documentado que el estrés tanto físico como psicológico puede disminuir los niveles de GSH (Zaidi y Banu, 2004; Şahin y Gümüşlü, 2007a y b; Atif et al., 2008; Kumar et al., 2009,

Singh y Kumar, 2008). No obstante, nuestros resultados muestran que la única región que mostró una disminución significativa en los niveles de GSH en respuesta al estrés agudo fue el hipocampo. De la misma forma, la administración aislada de L-CAR y DZ a animales control provocó una reducción significativa de los niveles de GSH en el hipotálamo e hipocampo, y no se observó que ninguno de los tratamientos empleados revirtiera o incrementará los niveles de GSH. Estos hallazgos comprometen la viabilidad de estos agentes para su empleo a nivel terapéutico, pues su efecto sobre el GSH es no deseable en el manejo de ninguna enfermedad.

Finalmente, los niveles de corticosterona son un indicador importante de estrés en modelos de experimentación en animales (Şahin y Gümüşlü, 2007). Los resultados obtenidos concuerdan y demuestran lo que previamente se ha reportado en la literatura (Djordjevic et al., 2003), en donde el estrés incrementa los niveles de corticosterona con respecto a controles, sugiriendo así que este es un buen biomarcador de estrés. La administración de L-CAR y DZ no generó ningún cambio significativo.

8. CONCLUSIONES

- Nuestra investigación muestra que el estrés por inmovilización aguda (x 24 hrs) induce daño oxidativo evidenciado mediante la cuantificación de TBARS en sinaptosomas; sin embargo, este daño ocurre de una forma región-específico (mayor en hipotálamo, estriado y corteza prefrontal).
- El pretratamiento con una dosis de L-CAR sólo mostró efectos protectores sobre la PL en hipotálamo, mientras que el uso de DZ demostró protección tanto en hipotálamo como en estriado, sin afectar aparentemente la corteza. Al mismo tiempo se colectó evidencia de actividad pro-oxidante de la administración aislada tanto de L-CAR como de DZ en hipocampo, lo que sugiere la necesidad de más estudios con éstos fármacos antes de su consideración para el diseño de terapias farmacológicas.
- No se observaron modificaciones significativas de la funcionalidad mitocondrial, ni en los niveles de GSH con el estrés, ni con el uso de los fármacos.
- El estrés agudo provocó disminución de la actividad de SOD también de una forma región-específico (solo en estriado e hipocampo), y sólo el tratamiento con L-CAR recuperó la actividad de la SOD en el estriado. Así mismo tanto L-CAR como DZ en animales control fueron capaces de provocar una reducción de la actividad de la SOD tanto en hipotálamo como en hipocampo.

- En conjunto, todos estos resultados sugieren un efecto regionalmente heterogéneo del estrés sobre el tejido nervioso, así como un efecto biológico de los fármacos utilizados que depende tanto de la región anatómica implicada, como de las condiciones normales o patológicas en las que se administra, pudiendo ejercer incluso efectos deletéreos en condiciones basales.
- La corticosterona fue alterada en los grupos sometidos a estrés, pero no presentó ningún cambio significativo con los tratamientos.
- Serán necesarios más estudios para conocer el sustrato biológico de las diferencias regionales observadas, basados en características anatómicas, neuroquímicas, y mecanismos de defensa que sirvan para apoyar la creación de nuevas estrategias terapéuticas que limiten el daño neuronal ejercido por el estrés.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Adachi T. y Wang X.L., 1998. Association of extracellular superoxide dismutase phenotype with the endothelial constitutive nitric oxide synthase polymorphism. *FEBS Letters* 433, 166-168.
- Alves E., Binienda Z., Carvalho F., Alves C.J., Fernandes E., Bastos M.L., Tavares M.V. y Summavielle T., 2009. Acetyl-L-carnitine provides effective in vivo neuroprotection over 3,4-methylenedioxymethamphetamine induced mitochondrial neurotoxicity in the adolescent rat brain. *Neuroscience* 158, 514-523.
- Ames B.N., Shigenaga M.K. y Hagen T.M., 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90, 7915-7922.
- Anisman H. y Matheson K., 2005. Stress, depression, and anhedonia: caveats concerning animals models. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29, 525-546.
- Anusuya M., Kokilavani V., Murali G. and Panneerselvam C., 2006. Oxidative stress-mediated macromolecular damage and dwindle in antioxidant status in aged rat brain regions: Role of L-carnitine and DL- α -lipoic acid. *Clinica Chimica Acta* 368, 84-92.
- Arockia-Rani J. y Panneerselvam C., 2002. Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats. *The Journals of Gerontology. Series A, Biological Sciences and Medicine Sciences* 57, B134-B137.
- Atif F., Yousuf S. y Agarwal S.K., 2008. Restraint stress-induced oxidative damage and its amelioration with selenium. *Europeana Journal of Pharmacology* 600, 59-63.
- Bandelow B., Zohar J., Hollander E., Kasper S. y Moller H.J., 2002. World Federation of Societies of Biological Psychiatry (WFSBP). Guidelines for the Pharmacological Treatment of Anxiety, Obsessive-Compulsive and Posttraumatic Stress Disorders. *The World Journal of Biological Psychiatry* 3, 171-199.
- Bao A.M., Meynen G. y Swaab D.F., 2008. The stress system in depression and neurodegeneration: Focus on the human hypothalamus. *Brain Research Reviews* 57, 531-553.

- Barhwal K., Hota S.K., Jain V., Prasad D., Singh S.B. y Ilavazhagan G., 2009. Acetyl-L-carnitine (ALCAR) prevents hypobaric hypoxia-induced spatial memory impairment through extracellular related kinase-mediated nuclear factor erythroid 2-related factor 2 phosphorylation. *Neuroscience* 161, 501-514.
- Bedard K y Krauze K.H., 2007. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiological Reviews* 87, 245-313.
- Berridge M.V. y Tan A.S., 1993. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 303, 474-482.
- Berry C.E. y Hare J.M., 2004. Xanthine oxidoreductase and cardiovascular disease: molecular mechanisms and pathophysiological implications. *The Journal of Physiology* 555, 589-606.
- Bierhaus A., Wolf J., Andrassy M., Rohleder N., Humpert P.M., Petrov D., Ferstl R., Von Eynatten M., Wendt T., Rudofsky G., Joswig M., Morcos M., Schwaninger M., McEwen B., Kirschbaum C., Nawroth P., 2003. A mechanism converting psychosocial stress into mononuclear cell activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100, 1920-1925.
- Bijl R.V., Ravelli A. y van Zessen G., 1998. Prevalence of psychiatric disorder in the general population: results of the Netherlands Mental Health Survey and Incidence Study (NEMESIS). *Social Psychiatry and Psychiatric Epidemiology* 33, 587-595.
- Buynitsky T. y Mostofsky D.I., 2009. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 33, 1089-1098.
- Cardoso-Pelaez F., Brooks P.J., Stedeford T., Song S. y Sanchez-Ramos J., 2000. DNA damage repair and antioxidant systems in brain regions: A correlative study. *Free Radicals Biology & Medicine* 28, 779-785.
- Carr A. y Frei B., 1999. Does vitamin C act as a pro-oxidant under physiological conditions? *The FASEB Journal* 13, 1007-1024.
- Castro A.A., Moretti M., Casagrande T.S., Martinello C., Petronilho F., Steckert A.V., Guerrini R., Calo G., Dal Pizzol F., Quevedo J. y Gavioli E.C., 2009. Neuropeptide S produces hyperlocomotion and prevents oxidative stress damage in the mouse brain: A comparative study with amphetamine and diazepam. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 91, 636-642.

- Catania C., Sotiropoulos I., Silva R., Onofri C., Breen K.C., Sousa N. y Almeida O.F.X., 2009. The amyloidogenic potential and behavioral correlates of stress. *Molecular Psychiatry* 14, 95-105.
- Chance B., Sies H y Boveris A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews* 59, 527-605.
- Costa E., Auta J., Grayson D.R., Matsumoto K., Pappas G.D., Zhang X. y Guidotti A., 2002. GABA_A receptors and benzodiazepines: a role for dendritic resident subunit mRNAs. *Neuropharmacology* 43, 925-937.
- Datson N.A., Morsink M.C., Meijer O.C. y de Kloet E.R., 2008. Central corticosteroid actions: Search for gene targets. *European Journal Pharmacology* 583, 272-289.
- Davies L.M., MacLellan C.L., Corbett D.R. y Colbourne F., 2004. Post-ischemic diazepam does not reduce hippocampal CA1 injury and does not improve hypothermic neuroprotection after forebrain ischemia in gerbils. *Brain Research* 1013, 223-229.
- De Kloet R., Vreugdenhil E., Oitzl M.Z. y Joëls M., 1998. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocrine Reviews* 19, 269-301.
- de Oliveira M.R., de Bittencourt-Pasquali M.A., Silvestrin R.B., Mello E Souza T. y Moreira J.C., 2007a. Vitamin A supplementation induces a prooxidative state in the striatum and impairs locomotory and exploratory activity of adult rats. *Brain Research* 1169, 112-119.
- de Oliveira M.R., Silvestrin R.B., Mello E Souza T. y Moreira J.C., 2007b. Oxidative stress in the hippocampus, anxiety-like behavior and decreased locomotory and exploratory activity of adult rats: Effects of sub acute vitamin A supplementation at therapeutic doses. *Neurotoxicology* 28, 1191-1199.
- de Oliveira M.R., Silvestrin R.B., Mello e Souza T. y Moreira J.C., 2008. Therapeutic vitamin A doses increase the levels of markers of oxidative insult in substantia nigra and decrease locomotory and exploratory activity in rats after acute and chronic supplementation. *Neurochemical Research* 33, 378-383.
- Derin N., Aydin S., Yargicoglu P. y Agar A., 2006. Changes in visual evoked potentials lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rats exposed to restraint stress: Effects of L-carnitine. *The International Journal of Neuroscience* 116, 205-221.

- Djordjevic J., Cvijic G. y Davidovic V., 2003. Different activation of ACTH and corticosterone release in response to various stressors in rats. *Physiological Research* 52, 67–72.
- Dong H., Yuede C.M., Yoo H.-S., Martin M.V., Deal C., Mace A.G. y Csernansky J.G., 2008. Corticosterone and related receptor expression are associated with increased β -amyloid plaques in isolated tg2576 mice. *Neuroscience* 177, 154-163.
- Donovan J. y Brown P., 2004. Handling and Restraint. *Current Protocols in Neuroscience Supplement* 27, A.4D.1-A.4D.6.
- Dowden J., Reid C., Dooley P. y Corbett D., 1999. Diazepam-induced neuroprotection: Dissociating the effects of hypothermia following global ischemia. *Brain Research* 829, 1-6.
- El-Sokkary G.H., 2008. Melatonin and vitamin C administration ameliorate diazepam-induced oxidative stress and cell proliferation in the liver of rats. *Cell Proliferation* 41, 168-176.
- Epel E.S., Blackburn E.H., Lin J., Dhabhar F.S., Adler N.E., Morrow J.D. y Cawthon R.M., 2004. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 101, 17312-17315.
- Esch T., Stefano G.B., Fricchione G.L. y Benson H., 2002. The role of stress in neurodegenerative diseases and mental disorders. *Neuroendocrinology Letters* 23, 199-208.
- Fernández-Checa J.C. y García-Ruiz C., 2008. Glutathión, en: Mina Konigsberg-Fainstein (Ed), *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México*, 253-268 pp
- Filipović D. y Pajović S.B., 2009. Differential regulation of CuZnSOD expression in rat brain by acute and/or chronic stress. *Cellular and Molecular Neurobiology* 29, 673-681.
- Galván-Arzate S., Pedraza-Chaverrí J., Medina-Campos O.N., Maldonado P.D., Vázquez-Román B., Ríos C. y Santamaría A., 2005. Delayed effects of thallium in the rat brain: Regional changes in lipid peroxidation and behavioral markers, but moderate alterations in antioxidants, after a single administration. *Food and Chemical Toxicology* 43, 1037-1045.
- Glavin G. B., Paré W. P., Sandbak T., Bakke H. y Murison R., 1994. Restraint stress in biomedical research: An update. *Neuroscience Biobehavioral Review* 18, 223-249.

- González F.J., 2005. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. *Mutation Research* 569, 101-110.
- Goyal R y Anil K., 2007. Protective effect of alprazolam in acute immobilization stress-induced certain behavioral and biochemical alterations in mice. *Pharmacological Reports* 59, 284-290.
- Guan Y., Hickey M.J., Borgstah G.E., Hallewell R.A., Lepock J.R., O'Connor D., Hsieh Y., Nick H.S., Silverman D.N. y Tainer J.A., 1998. Crystal structure of Y34F mutant human mitochondrial manganese superoxide dismutase and the functional role of tyrosine 34. *Biochemistry* 37, 4722-4730.
- Gülçin I., 2006. Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine. *Life Science* 78, 803-811.
- Haber F. y Weiss J., 1934. The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by iron salts. *Proceedings of the Royal Society of London, Series A* 147, 332-351.
- Hagen T.M., Ingersoll R.T., Wehr C.M., Lykkesfeldt J., Vinarsky V., Bartholomew J.C., Song M. y Ames B.N., 1998. Acetyl-L-carnitine fed to old rats partially restores mitochondrial function and ambulatory activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 95, 9562-9566.
- Hagen T.M., Liu J., Lykkesfeldt J., Wehr C.M., Ingersoll R.T., Vinarsky V., Bartholomew J.C. y Ames B.N., 2002. Feeding acetyl-L-carnitine and lipoic acid to old rats significantly improves metabolic function while decreasing oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 99, 1870-1875.
- Hall E.D., Vaishnav R.A. y Mustafa A.G., 2010. Antioxidant therapies for traumatic brain injury. *Neurotherapeutics* 7, 51-61.
- Halliwell B. y Chirico S., 1993. Lipidperoxidation: its mechanism, measurement and significance. *American Journal of the Clinical Nutrition* 57, 715S-725S.
- Halliwell B. y Gutteridge J.M.C., 1984. Oxygen toxicology, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochemical Journal* 219, 1-4.
- Hansberg-Torres W., 2008. El dioxígeno y sus especies reactivas, en: Mina Konigsberg-Fainstein (Ed), *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México*, 25-48 pp.

- Heiss W.D. y Herholz k., 2006. Brain receptor imaging. *The Journal of Nuclear Medicine* 47, 302-312.
- Hille R. y Nishino T., 1995. Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *The FASEB Journal* 9, 995-1003.
- Hissin P.J. y Hilf R., 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry* 74, 214-226.
- Ho Y.S., Magnenat J.L., Gargano M. y Cao J., 1998. The nature of antioxidant defense mechanisms: A lesson from transgenic studies. *Health Perspect* 106, 1219-1228.
- Hoppel C., 2003. The role of carnitine in normal and altered fatty acid metabolism. *American Journal of Kidney Disease* 41, S4-S12.
- Hunt C., Sim J.E., Sullivan S.J., Featherstone T., Golden W., Kapp-Herr C.V., Hock R.A., Gómez R.A., Parsian A.J. y Spitz D.R., 1998. Genomic instability and catalase gene amplification induced by chronic exposure to oxidative stress. *Cancer Research* 58, 3986-3992.
- Ishii T., Shimpo Y. y Kinoshita K., 2000. Anti-apoptotic effect of acetyl-L-carnitine and L-carnitine in primary cultured neurons. *Japanese Journal of Pharmacology* 83, 119-124.
- İzgüt-Uysal V.M., Bülbül M., Tan R., Derin N., Üstünel I., Ađar A. y Yargiđođlu P., 2007. Effect of chronic stress and l-carnitine on rat stomach. *The Journal of Physiological Sciences* 57, 187-192.
- Jaroenporn S., Nagaoka K., Kasahara C., Ohta R., Watanabe G. y Taya K., 2007. Physiological roles of prolactin in the adrenocortical response to acute restraint stress. *Endocrine Journal* 54, 703-711.
- Jiménez-Velázquez G., López-Muñoz F.J. y Fernández-Guasti A., 2008. Participation of the GABA/benzodiazepine receptor and the NO-cyclicGMP pathway in the “antinociceptive-like effects” of diazepam. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 91, 128-133.
- Jones L.L., McDonald D.A. y Borum P.R., 2010. Acylcarnitines: Role in brain. *Progress in Lipid Research* 49, 61-75.
- Juliet P.A., Joyee A.G., Jayaraman G., Mohankumar M.N. y Panneerselnam C., 2005. Effect of L-carnitine on nucleic acid status of aged rat brain. *Experimental Neurology* 191, 33-40.

- Kakkar P. y Singh B.K., 2007. Mitochondria: a hub of redox activities and celular distress control. *Molecular and Cellular Biochemistry* 305, 235-253.
- Karin M., 1998. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable?. *Cell* 93, 487-490.
- Kerner J. y Hoppel C., 2000. Fatty acid import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1486, 1-17.
- Kessler R.C., Chiu W.T., Demler O. y Walters E.E., 2005. Prevalence, severity, and comorbidity of twelve-month DSM-IV disorders in the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R). *Archives of General Psychiatry* 62, 617-627.
- Kidd P.M., 2005. Neurodegeneration from mitochondrial insufficiency: nutrients stem cells, growth factors, and prospects for brain rebuilding using integrative management. *Alternative Medicine Review* 10, 268-293.
- Kisker C., Schindelin H. y Rees D.C., 1997. Molybdenum-cofactor-containing enzymes: structure and mechanism. *Annuals Reviews of Biochemistry* 66, 233-267.
- Kondo K., 1996. Rising prevalence of neurodegenerative diseases worldwide. *Internal Medicine* 35: 238.
- Konigsberg-Fainstein M., 2008a. Cadena respiratoria mitocondrial, en: Mina Konigsberg-Fainstein (Ed), *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México*, 49-60 pp.
- Konigsberg-Fainstein M., 2008b. Sistemas microsomales de monooxigenasas, citocromo P₄₅₀, en: Mina Konigsberg-Fainstein (Ed), *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México*, 61-72 pp.
- Kovacs P., Juranek I., Stankovicova T. y Svec P., 1996. Lipid peroxidation during acute stress. *Pharmazie* 51, 51-53.
- Kowaltowsky A.J., de Souza-Pinto N. C., Castilho R.F., Verseci A.E., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology & Medicine*, 47. 333-343.
- Kumar A. y Goyal R., 2007. Possible involvement of GABAergic modulation in the protective effect of gabapentin against immobilization stress induced behavior alterations and oxidative damage in mice. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 21, 575-581.

- Kumar A., Goyal R. y Prakash A., 2009. Possible GABAergic mechanism in the protective effect of allopregnenolone against immobilization stress. *European Journal of Pharmacology* 602, 343-347.
- Liu J., Wang X. y 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.
- Liu J., Wang X., Shigenaga M.K., Yeo H. C., Mori A. y Ames B., 1996. Immobilization stress causes oxidative damage to lipid, protein, and DNA in the brain of rats. *FASEB Journal* 10, 1532-1538.
- Liu J., y Mori A., 1999. Stress, aging and brain oxidative damage. *Neurochemical Research* 24, 1479-1497.
- Long J., Gao F., Tong L., Cotman C.W., Ames B.N. y Liu J., 2009. Mitochondrial decay in the brains of old rats: Ameliorating effect of alpha-lipoic acid and acetyl-L-carnitine. *Neurochemical Research* 34, 755-763.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. y Randall R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 193, 265-267.
- Lowy M.T., Wittenberg L. y Yamamoto B.K., 1995. Effect of acute stress on hippocampal glutamate levels and spectrin proteolysis in young and aged rats. *Neurochemistry* 65, 268-274.
- Madrigal J.L.M., Moro M.A., Lizasoain I., Lorenzo P., Fernández A.P., Rodrigo J. y Leza J.C., 2001. Induction of cyclooxygenase-2 account of restraint stress-induced oxidative status in rat brain. *Neuropsychopharmacology* 24, 420-429.
- Madrigal J.L.M., García-Bueno B., Moro M.A., Lizasoain I., Lorenzo P. y Leza J.C., 2003. Relationship between cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in rat cortex after stress. *European Journal of Neuroscience* 18, 1701-1705.
- Mamczarz J., Budziszewska B., Antkiewicz-Michaluk L. y Vetulani J., 1999. The Ca²⁺ channel blockade changes the behavioral and biochemical effects of immobilization stress. *Neuropsychopharmacology* 20, 248-254.
- Marini F., Pozzato C., Andreetta V., Jansson B., Arban R., Domenici E. y Carboni L., 2006. Single exposure to social defeat increases corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptor mRNA expression in rat hippocampus. *Brain Research* 1067, 25-35.

- Matsumoto K., Yobimoto K., Huong N.T., Abdel-Fattah M., Van Hien T. y Watanabe H., 1999. Psychological stress-induced enhancement of brain lipid peroxidation via nitric oxide systems and its modulation by anxiolytic and anxiogenic drugs in mice. *Brain Research* 839: 74-84.
- Matés J.M. y Sánchez-Jiménez F., 1999. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiologic processes. *Frontiers in Bioscience* 4, 339-345.
- McEwen B.S., 1999. Stress and the aging hippocampus. *Frontiers in Neuroendocrinology* 20, 49-70.
- McEwen B.S., 2000. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research* 886, 172-189.
- McEwen B.S., 2007. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: Central role of the brain. *Physiol Rev* 87, 873-904.
- McGivern R., Rittenhouse P., Aird F., Van de Kar L.D. y Redei E., 1997. Inhibition of stress-induced neuroendocrine and behavioral responses in the rat by prepro-thyrotropin-releasing hormone 178-199. *The Journal of Neuroscience* 17, 4886-4894.
- Meerlo P., Overkamp G.J., Benning M.A., Koolhaas J.M. y Van den Hoofdakker R.H., 1996. Long-term changes in open field behaviour following a single social defeat can be reversed by sleep deprivation. *Physiology & Behavior* 60, 115-119.
- Meijer O. C., 2006. Understanding stress through the genome. *Stress* 9, 61-67.
- Miranda L.D., 2008. Química de los radicales libres, en: Mina Konigsberg-Fainstein (Ed), *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México*, 3-24 pp.
- Miyoshi M, Ito H, Arakawa R, Takahashi H, Takano H, Higuchi M, et al. Quantitative analysis of peripheral benzodiazepine receptor in the human brain using PET with 11C-AC-5216. *J Nuclear Med* 2009; 50: 1095-101.
- Moini H., Packer L. y Saris N.E., 2002. Antioxidant and prooxidant activities of α -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicology and Applied Pharmacology* 182, 84-90.
- Mosmann T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65, 55-63.

- Musavi S. y Kakkar P., 1998. Diazepam induced early oxidative changes at the subcellular level in rat brain. *Molecular and Cellular Biochemistry* 178: 41-46.
- Musavi S. y Kakkar P., 2000. Pro and antioxidant responses to repeated administration of diazepam in rat brain. *Molecular and Cellular Biochemistry* 206: 97-103.
- Musavi S. y Kakkar P., 2003. Effect of diazepam treatment and its withdrawal on pro/antioxidative processes in rat brain. *Molecular and Cellular Biochemistry* 245, 51-56.
- Mutomba M.C., Yuan H., Konyavko M., Adachi S., Yokohama B., Esser V., McGarry D., Babior B.M. y Gottlieb R.A., 2000. Regulation of the activity of caspases by L-carnitine and palmitoylcarnitine. *FEBS Letters* 478, 19-25.
- Niki E., 2008. Lipid peroxidation products as oxidative stress biomarkers. *BIOFactors* 34, 171-180.
- Nirmal J., Babu C.S., Harisudhan T. y Ramanathan M., 2008. Evaluation of behavioural and antioxidant activity of *Cytisus scoparius* link in rats exposed to chronic unpredictable mild stress. *BMC Complement Altern Med* 8, 15.
- Ogino K. y Wang D.H., 2007. Biomarkers of oxidative/nitrosative stress: An approach to disease prevention. *Acta Medica Okayama* 61, 181-189.
- Okado-Matsumoto A. y Fridovich I., 2001. Subcellular distribution of superoxide dismutase (SOD) in rat liver. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 38388-38393.
- Orrenius S., 2007. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drugs Metabolism Reviews* 39, 443-455.
- Pajovic S.B., Pejic S., Stojiljkovic V., Gavrilovic L., Dronjak S. y Kanazir D.T., 2005. Alterations in hippocampal antioxidant enzyme activities and sympatho-adrenomedullary system of rats in response to different stress models. *Physiological Research* 55, 553-560.
- Papa S., 1996. Mitochondrial oxidative phosphorylation changes in the life span. *Molecular aspects and physiopathological implications. Biochimica et Biophysica Acta* 1276, 87-105.
- Paradies G., Ruggiero F. M., Petrosillo G., Gadaleta M.N. y Quagliariello E., 1994. Effect of aging and acetyl-L-carnitine on the activity of cytochrome oxidase and adenine nucleotide translocase in rat heart mitochondria. *FEBS Letters* 350, 213-215.

- Paradies G., Petrosillo G., Gadaleta M.N. y Ruggiero F.M., 1999. The effect of aging and acetyl-L-carnitine on the pyruvate transport and oxidation in rat heart mitochondria. *FEBS Letters* 454, 207-209.
- Paravicini T.M. y Touyz R.M., 2008. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension. *Diabetes Care* 31, S170-S180.
- Pardon M.C., 2007. Stress and ageing interactions: A paradox in the context of shared etiological and physiopathological processes. *Brain Research Reviews* 54, 251-273.
- Pardon M.C. y Rattray I., 2009. What do we know about the long-term consequences of stress on ageing and the progression of age-related neurodegenerative disorders?. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32, 1103-1120.
- Peraza-Reyes L., 2008. Catalasa, en: Mina Konigsberg-Fainstein (Ed), *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México*, 183-200 pp.
- Pérez-De La Cruz V., Gozález-Cortés C., Pedraza-Chaverrí J., Maldonado P.D., Andrés-Martínez L. y Santamaría A., 2006. Protective effect of S-allylcysteine on 3-nitropropionic acid-induced lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in rat brain synaptosomes. *Brain Reserach Bulletin* 68, 379-383.
- Psarra A.G. y Sekeris C.E., 2009. Glucocorticoid receptors and other nuclear transcription factors in mitochondria and possible functions. *Biochimica et Biophysica Acta* 1787, 431-6.
- Poyton R.O., Ball K.A. y Castello P.R., 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 20, 332-340.
- Puddu P., Puddu G.M., Cravero E., Rosati M. y Muscari A., 2008. The molecular sources of reactive oxygen species in hypertension. *Blood Pressure* 17, 70 -77.
- Radak Z., Sasvari M., Nyakas C., Kaneko T., Tahara S., Ohno H. y Goto S., 2001. Single bout of exercise eliminates the immobilization-induced oxidative stress in rats. *Neurochemistry International* 39: 33-38.
- Rajasekaran K., 2005. Seizure-induced oxidative stress in rat brain regions: blockade by nNOS inhibition. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 80, 263-272.

- Roberts R.A., Laskin D.L., Smith C.V., Robertson F.M., Allen E.M.G., Doorn J.A. y Slikker W., 2009. Nitrate and oxidative stress in toxicology and disease. *Toxicological Sciences* 112, 4-16.
- Şahin E. y Gümüşlü S., 2007a. Stress-dependent induction of protein oxidation, lipid peroxidation and anti-oxidants in peripheral tissues of rats: comparison of three stress models (immobilization, cold and immobilization-cold). *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 34, 425-431.
- Şahin E. y Gümüşlü S., 2007b. Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defenses system. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP* 144, 342-347.
- Santamaría A., Salvatierra-Sánchez R., Vázquez-Román B., Santiago-López D., Villeda-Hernández J., Galván-Arzate S., Jiménez-Capdeville M.E. y Ali S.F., 2003. Protective effects of the antioxidant selenium on quinolinic acid-induced neurotoxicity in rats: in vivo and in vitro studies. *Journal of Neurochemistry* 86: 479-488.
- Santamaría D., Espinoza-González V., Ríos C. y Santamaría A., 1999. *N ω* -Nitro-L-arginine, a nitric synthase inhibitor, antagonizes quinolinic acid-induced neurotoxicity and oxidative stress in rat striatal slices. *Neurochemistry Research* 24, 843-849.
- Sapolski R.M., 1996. Stress, glucocorticoids, and damage to the nervous system: The current state of confusion. *Stress* 1, 1-19.
- Sas K., Robotka H., Toldi J. y Vécsei L., 2007. Mitochondria, metabolic disturbances, oxidative stress and the kynurenine system, with focus on neurodegenerative disorders. *Journal of the Neurological Sciences* 257, 221-239.
- Savitha S., Tamilselvan J., Anusuyadevi M. y Panneerselvam C., 2005. Oxidative stress on mitochondrial antioxidant defense system in the aging process: Role of DL-alpha-lipoic acid and L-carnitine. *Clinica Chimica Acta* 355, 173-180.
- Savitha S. y Panneerselvam C, 2006. Mitochondrial membrane damage during aging process in rat heart: Potential efficacy of L-carnitine and DL α lipoic acid. *Mechanism of Ageing and Development* 127, 349-355.
- Sayre L.M., Perry G. y Smith M.A., 2008. Oxidative stress and neurotoxicity. *Chemical Research in Toxicology* 21, 172-188.

- Schwartz R.D., Huff R.A., Yu X., Carter M.L. y Bishop M., 1994. Postischemic diazepam is neuroprotective in the gerbil hippocampus. *Brain Research* 647,153-160.
- Schwartz R.D., Yu X., Katzman M.R., Hayden-Hixson D.M. y Perry J.M., 1995. Diazepam, given postischemia, protects selectively vulnerable neurons in the rat hippocampus and striatum. *Journal of Neuroscience* 15, 529-539.
- Selye, H., 1936. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 138, 32.
- Selye, H., 1950. *Stress*. Acta Medical Publisher.
- Selye H. y Fortier C., 1950. Adaptive Reaction to Stress. Proceedings of the Association for Research in Nervous and Mental Disease of the 29A Annual Meeting, 149-157.
- Shigenaga M.K., Hagen T.M. y Ames B.N., 1994. Oxidative damage and mitochondrial decay in aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91, 10771-10778.
- Sieghart W. y Sperk G., 2002. Subunit composition, distribution and function of GABA(A) receptor subtypes. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2, 795-816.
- Silva-Adaya D., Pérez-De La Cruz V., Herrera-Mundo M.N., Mendoza-Macedo K., Villeda-Hernandez J., Binienda Z., Ali S.F. y Santamaría A., 2008. Excitotoxic damage, disrupted energy metabolism, and oxidative stress in the rat brain: antioxidant and neuroprotective effects of L-carnitine. *Journal of Neurochemistry* 105, 677-689.
- Singh A y Kumar A., 2008. Protective effect of alprazolam against sleep deprivation-induced behavior alterations and oxidative damage in mice. *Neuroscience Research* 60, 372-379.
- Siqueira I.R., Fochesatto C., de Andrade A., Santos M., Hagen M., Bello-Klein A. y Netto C.A., 2005. Total antioxidant capacity is impaired in different structures from aged rat brain. *International Journal of Developmental Neuroscience* 23, 663-671.
- Sivilotti L. y Nistri A., 1991. Gaba receptor mechanisms in the central nervous system. *Progress in Neurobiology* 36, 35-92.

- Sumimoto H., 2008. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *The FEBS Journal* 275, 3249-3277.
- Swaab D.F., Bao A.M. y Lucassen P.J., 2005. The stress system in the human brain in depression and neurodegeneration. *Ageing Research Reviews* 4, 141-194.
- Swiergel A.H., Zhou Y. y Dunn A.J., 2007. Effects of chronic footshock, restraint and corticotropin-releasing factor on freezing, ultrasonic vocalization and forced swim behavior in rats. *Behavioural Brain Research* 183, 178-187.
- Swiergel A.H., Leskov I.G. y Dunn A.J., 2008. Effects of chronic and acute stressors and CRF on depression-like behavior in mice. *Behavioural Brain Research* 186, 32-40.
- Turner R.J. y Lloyd D.A., 2004. Stress Burden and the Lifetime Incidence of Psychiatric Disorder in Young Adults. *Archives of General Psychiatry* 61, 481-488.
- Valko M., Leibfritz D., Moncol J., Cronin M.T.D., Mazur M. y Telser J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 39, 44-84.
- Virmani A. y Binienda Z., 2004. Role of carnitine esters in brain neuropathology. *Molecular Aspects of Medicine* 25, 533-549.
- Warner D.S., Sheng H. y Batinić-Haberle I., 2004. Oxidants, antioxidants and the ischemic brain. *The Journal of Experimental Biology* 207, 3221-3231.
- Werck-Reichhart D. y Feyereisen R., 2000. Cytochromes P450: a success story. *Genome Biology* 1, 3003.1-3003.9
- Whiting P.J., 2006. GABA-A receptors: a viable target for novel anxiolytics?. *Current Opinion in Pharmacology* 6, 24-29.
- Yasui F., Imai Y., Matsugo S., Sasaki K. y Konishi T., 2002. Antioxidant and/or prooxidant activities of carnitine and its derivative on the hydroxyl radical generation by the Fenton reaction. *ITE Lett Batter New Technol Med* 3, 58-62.
- Zaidi S.M.K.R., Al-Qirim T.M., Hoda N. y Banu N., 2003. Modulation of restraint stress induced oxidative changes in rats by antioxidant vitamins. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 14, 633-636.

- Zaidi S.M.K.R. y Banu N., 2004. Antioxidant potential of vitamins A, E and C in modulating oxidative stress in rat brain. *Clinica Chimica Acta* 340, 229-233.
- Zenteno T. y Saldaña Y., 2008. Daño a lípidos, en: Mina Konigsberg-Fainstein (Ed), *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Manual Moderno. México*, 135-140 pp.