



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico inducidas por estrés emocional en modelo animal

TESIS

Que para obtener el título de:

Químico Farmacéutico Biólogo

Presenta: Amaranta Meneses Ortiz

Director de Tesis Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell

Asesor interno: Dra. Raquel Retana Ugalde

Ciudad de México 2018



**FES
ZARAGOZA**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo fue realizado en el Instituto Nacional de Perinatología, del cual el Dr. Jorge Arturo Cardona Pérez es director, en el laboratorio de Inmunobioquímica, 3^{er} piso de la torre de investigación, bajo la dirección del Dr. Alberto Martín Guzmán Grenfell y la asesoría interna en la FES Zaragoza de la Dra. Raquel Retana Ugalde.

Se contó a su vez con el apoyo alimenticio para alumnos que realizan trabajo investigación en el instituto. También se contó con la beca de titulación otorgada por la UNAM.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme formarme como Q.F.B. dentro de sus aulas y por las diferentes becas otorgadas que me ayudaron enormemente a culminar mis estudios.

Al Instituto Nacional de Perinatología Isidro Espinosa de los Reyes por abrirme las puertas para realizar mi servicio social y tesis de Licenciatura.

Dedicatoria

A mi madre

A mi primera y más antigua luz guía, quien ha dado siempre todo por mi bienestar y felicidad, de quien aprendí que todo esfuerzo tiene su recompensa y que sin escatimar esfuerzo alguno, ha sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme. Porque sin ella no sería la persona que soy ahora. Por tu paciencia y amor incondicional gracias.

A mi hermana

De quien siempre he recibido cariño, comprensión, los mejores consejos y por estar siempre en las buenas y en las malas conmigo, pero sobre todo por ser la persona más especial en mi vida gracias.

A mi familia

Por ser una gran un apoyo continuo, por sus buenos consejos y por su cariño gracias.

A mis maestros

Por sus oportunas palabras al formarme como profesionista y por su apoyo durante el camino.

Al Dr. Guzmán y la Dra. Margarita López por su motivación para seguir adelante en este proyecto, y por el conocimiento que compartieron conmigo.

A las personas que han tocado mi vida para ayudarme a aprender lo que se necesita aprender, ya sea que lo quiera o no y por apoyar mi transformación en la persona que soy ahora.

“los hombres deben saber que el cerebro es el responsable exclusivo de las alegrías, placeres, risa y diversión, la pena, desaliento y las lamentaciones. Y gracias al cerebro de manera especial, adquirimos sabiduría y conocimientos, y vemos y oímos lo que es repugnante y lo que es bello, lo que es malo y bueno...Gracias a este órgano nos volvemos locos y deliramos y los miedos y terrores nos asaltan. Debemos soportar todo esto cuando el cerebro no está sano y en ese sentido soy de la opinión de que la víscera ejerce en el ser humano el mayor poder.”

Hipócrates. Sobre la enfermedad sagrada

"Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental."

Santiago Ramón y Cajal

Tabla de contenido

Introducción	9
Marco Teórico	11
Estrés oxidativo	11
Radicales libres	11
Formaciones de los radicales libres	11
Cadena respiratoria o cadena transportadora de electrones.....	12
Anión superóxido	14
Peróxido de Hidrógeno	15
Radical hidroxilo.....	16
Singulete de oxígeno	17
Reacciones de los radicales libres	18
Biomarcadores de estrés oxidativo.....	20
Sulfhidrilos totales	20
Capacidad antioxidante	20
Cuantificación de las modificaciones (daño) a proteínas causadas por las reacciones de hidroxilación inducidas por el radical hidroxilo	21
Malondialdehido	22
Enzimas relacionadas con el metabolismo del óxido nítrico	24
Actividad de la enzima Arginasa	24
Nitratos y nitritos	24
Actividad de la enzima S -Nitrosoglutatión reductasa	25
Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.	27
Sistemas de defensa antioxidante	28
Antioxidantes enzimáticos	29
Antioxidantes no enzimáticos	31
El Óxido nítrico y su implicación fisiológica	37
S-nitrosotioles y S-nitroso glutatión reductasa.....	39
Estrés nitrosante	40
Estrés psicológico y estrés oxidativo.....	41
Eustrés	42
Distrés	42
Ansiedad y depresión por estrés crónico	43
Estrés perinatal	44

Programación	45
Fisiología del Estrés	47
Planteamiento del problema	51
Hipótesis	52
Objetivos	53
Material y métodos	54
Diseño	54
Universo	54
Variables	54
Descripción de la metodología	55
Apareamiento	55
Inducción de estrés prenatal por restricción de movimiento (ECR)	56
Inducción del estrés postnatal por separación materna (ESM)	56
Técnicas bioquímicas para la medición de biomarcadores de estrés oxidativo y metabolismo del óxido nítrico	58
Cuantificación de nitritos	58
Determinación de la actividad de la enzima arginasa	58
Cuantificación de proteínas por el método de Lowry	59
Capacidad antioxidante por el método de CUPRAC	59
Cuantificación de daño a proteínas por hidroxilación	59
Cuantificación de sulfhidrilos totales	60
Actividad de la enzima Glutación reductasa en cerebro	60
Cuantificación de Malondialdehído en cerebro	60
Resultados biomarcadores de estrés oxidativo	61
Resultados del metabolismo del óxido nítrico	67
Análisis de resultados	73
Conclusiones	78
Referencias Bibliográficas	79

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
%	Porcentaje
µg	Microgramo
µl	Microlitro
°C	Grados centígrados (Celsius).
ACTH	Hormona adrenocorticotropa.
ADN	Ácido desoxirribunocléico
AMPc	Adenosin-monofosfato cíclico
ATPasa	Cinasa dependiente de Adenosin Trifosfato
BSNO	S-nitroso albúmina
Ca ⁺⁺ .	Calcio
CRH	Hormona liberadora de corticotropinas. (Corticotropines reelease hormone).
CySNO	S-nitroso-L-cisteína
ECR	Estrés restricción de movimiento
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
FH	Hormona foliculoestimulante
GH	Hormona del crecimiento (Growing Hormone)
GSNO	S Nitrosoglutatión
HHA	Hipotálamo Hipófisis Adrenal
HT	Hormonas Tiroideas
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
MDA	Malondialdehido
M+/P+	Madre estresada/ Progenie estresada
M+/P-	Madre estresada/ Progenie no estresada
M-/P+	Madre no estresada/ Progenie estresada
M-/P-	Madre no estresada/ Progenie no estresada
mg/dL	Miligramos/decilitro
MR	Receptor a mineralocorticoides.
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NADPH	Nicotin adenosin difosfato reducido
P	Valor de significancia <0.05
pH	Potencial de hidrógeno
SM	Separación maternal
SNC	Sistema Nervioso Central
SNP	Sistema Nervioso Parasimpático
SNS	Sistema Nervioso Simpático
SRAA	Sistema Renina Angiotensina Aldosterona.
TSH	Hormona estimulante de tiroides. (Tiroid Stimulate Hormone)

Estrés oxidativo y alteraciones en el metabolismo del óxido nítrico inducidas por estrés emocional en modelo animal

Introducción

El estrés oxidativo es causado por el desbalance entre los prooxidantes y los antioxidantes, en favor de los prooxidantes. El daño oxidativo a células y órganos puede ser causado por radicales libres o por moléculas como peróxido de hidrógeno y sus derivados llamados especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERN). Estas moléculas están presentes en el cuerpo de manera cotidiana como parte de la regulación de diferentes procesos, por ejemplo en la fagocitosis, apoptosis, fertilización del óvulo, etc. Sin embargo si ERO Y ERN se producen en gran cantidad en el lugar inadecuado pueden causar modificaciones oxidativas de lípidos, proteínas y ADN. También pueden verse modificadas las membranas celulares, la función de receptores, la función enzimática y la actividad de ciertos genes. Para combatir contra la excesiva producción de ERO Y ERN el organismo tiene mecanismos de protección contra los efectos tóxicos producidos por los radicales libres.

El estrés es un término que describe la respuesta fisiológica inadecuada de un organismo, a cualquier demanda física, mental o emocional ya sea real o imaginaria. En este caso el cuerpo iniciará una serie de acciones para defenderse de la circunstancia que lo haya alterado, en este caso será la activación del sistema nervioso simpático el cual tendrá que movilizar al cuerpo para luchar o huir, lo cual puede ser visto como una respuesta adaptativa a corto plazo para situaciones de emergencia. Los problemas comienzan a ocurrir cuando dichas situaciones de alerta se vuelven algo recurrente y comienzan a modificarse las funciones normales del organismo.

Una respuesta producida en el cuerpo debida al estrés fisiológico es la liberación de glucocorticoides por parte de la glándula adrenal, la cual es causada por la activación del eje hipotálamo hipófisis adrenal. Dicha activación modificará el sistema reducción-oxidación (redox).

El sistema redox es un mecanismo químico presente en diversas partes del organismo y tiene como función el mantener el equilibrio entre oxidantes y

reductores. Cuando este equilibrio se ve modificado, ocurre la condición conocida como estrés oxidativo. El aumento del estrés oxidativo y nitrosativo aunado a una disminución en la capacidad antioxidante cerebral son factores involucrados en la etiología de enfermedades neuropsiquiátricas.

El cerebro es un metabolizador de oxígeno pero tiene mecanismos de protección antioxidante relativamente débiles. Una gran cantidad de evidencia sugiere que altos niveles de ERO están íntimamente ligados con la aparición de muerte neuronal en diferentes desórdenes psiquiátricos (autismo, déficit de atención, depresión y esquizofrenia) y enfermedades crónicas (Parkinson y Alzheimer).

Existen numerosos estudios en animales que demuestran cómo el estrés prenatal materno puede causar alteraciones en la cría. El estrés prenatal inducido experimentalmente, produce diversas alteraciones en la conducta de la prole, tales como una disminución del comportamiento típico de género, incremento de la respuesta al estrés y retardo neuromotor. Estos hechos sugieren que el estrés emocional, afecta al ambiente intrauterino y el desarrollo cerebral del feto.

En el presente trabajo se midieron diferentes biomarcadores de estrés oxidativo (capacidad antioxidante total, daño a proteínas por hidroxilación, sulfhidrilos totales) y biomarcadores del metabolismo del óxido nítrico (nitratos y nitritos, actividad de la enzima arginasa y actividad de la enzima GSNO reductasa) en tejido cerebral (corteza prefrontal, hipocampo y corteza basal anterolateral) y plasma de crías de ratas sometidas a estrés por separación materna de madres estresadas por restricción del movimiento con el fin de determinar si ambas condiciones están relacionadas.

Marco Teórico

Estrés oxidativo

El proceso de metabolismo aeróbico utiliza oxígeno para generar ATP en la cadena transportadora de electrones mitocondrial. Durante este proceso 1-3% de todos los electrones se escapan de dicha cadena para reaccionar con moléculas de oxígeno, generando especies reactivas de oxígeno (ERO) y especies reactivas de nitrógeno (ERON) en lugar de ser reducido hasta agua. Las ERO y ERN también pueden ser producidas por factores ambientales como pueden ser contaminantes del aire, humo de cigarro o por cuestiones endógenas como activación exacerbada del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal. Las ERO y ERN son moléculas muy reactivas y pueden dañar diversas biomoléculas como carbohidratos, ácidos nucleicos, lípidos y proteínas alterando su función celular. El cambio en el balance entre oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes se conoce como estrés oxidativo. La regulación del estado de reducción y oxidación (redox) es crítico para la viabilidad de una célula, su activación, proliferación y funciones de los organelos.^{1,2}

Los organismos aeróbicos han desarrollado sistemas antioxidantes, los cuales incluyen sistemas enzimáticos y no enzimáticos, dichos mecanismos son usualmente efectivos en bloquear los efectos dañinos de las especies reactivas del oxígeno (ERO). Sin embargo en condiciones patológicas los sistemas antioxidantes pueden ser superados. El estrés oxidativo contribuye a diferentes condiciones patológicas y enfermedades, incluidas cáncer, desórdenes neurológicos, aterosclerosis, hipertensión, isquemia/reperfusión, diabetes, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, asma, así como en el envejecimiento celular.²

Radicales libres

Los radicales libres son especies químicas que tienen un electrón desapareado que los habilita como fragmentos moleculares muy reactivos. Entre los radicales de interés para la biología y medicina que constituyen el grupo de las ERO, se encuentran los derivados del oxígeno: su singulete

O_2^* , así como los radicales superóxido $O_2^{\cdot-}$, e hidroxilo OH^{\cdot} ; también se incluye al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), que no es propiamente un radical libre pero si una especie reactiva del oxígeno.

La producción controlada de radicales libres permite la realización de varios procesos fisiológicos por ejemplo en la fertilización del óvulo por el espermatozoide o su participación en los mecanismos de defensa del organismo durante una infección realizando lisis bacteriana entre otras. Sin embargo un exceso de las especies reactivas en ausencia o disminución de la actividad de los sistemas antioxidantes que las regulan puede llevar a una condición metabólica denominada estrés oxidante que provoca desde el daño celular hasta la muerte celular.³

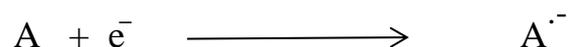
Formación de radicales libres

Existen dos mecanismos de formación de radicales:

1. Por rompimiento homolítico de un enlace covalente de una molécula estable



2. Por transferencia de electrones, en la cual una molécula estable gana un electrón



Cadena respiratoria o cadena transportadora de electrones

Es una de las fuentes más importantes de ATP en las células de los mamíferos y por esto es esencial para la vida. Durante la transducción de energía un numero de electrones se “fugan” al oxígeno prematuramente formando el radical superóxido, el cuál ha sido encontrado como el responsable de la causa de la fisiopatología de una gran número de enfermedades.⁴

La cadena respiratoria en la membrana mitocondrial es una de las partes estructurales y funcionales de la mitocondria. Está compuesta por

complejos llamados I, II, III, IV, los cuales transfieren los electrones, desde las coenzimas reducidas (NADH y FADH₂) hasta el oxígeno molecular.

En condiciones normales 1-5% del oxígeno es convertido en ERO así la mayoría de los estudios sugieren que mucha de la producción intracelular de ERO es formada por acción de la mitocondria.

Bajo condiciones metabólicas normales el complejo III es el principal sitio de la producción de ERO, así que el ataque de los radicales libres usualmente sucede en los complejos de la cadena respiratoria. Los complejos I y III también son considerados sitios formadores de diferentes ERO.

El daño oxidativo se produce debido a la persistente exposición a las ERO en la mitocondria y lípidos celulares, proteínas y ácidos nucleicos. La exposición aguda a las ERO resulta en la mal función de los centros Fe-S de la cadena transportadora de electrones, específicamente en los complejos I, II, III y el ciclo de los ácidos tricarbónicos resultando en la disminución de la producción de energía celular.

Ya que la mitocondria produce ATP para la célula por fosforilación oxidativa, las moléculas involucradas en dicha síntesis también son susceptibles al estrés oxidativo promoviendo la apoptosis. La mitocondria a su vez contiene enzimas redox las cuales están involucradas en la transferencia de electrones de un sustrato a otro, así si hay ineficiencias en el proceso se generaran especies reactivas del oxígeno.

El Sistema nervioso central depende muchísimo de la función mitocondrial, esto porque el SNC tiene una demanda enorme de energía. Debido a la generación de ERO y factores ambientales ocurren mutaciones en el DNA mitocondrial, lo cual lleva a una falla energética y enfermedades neurodegenerativas.⁵

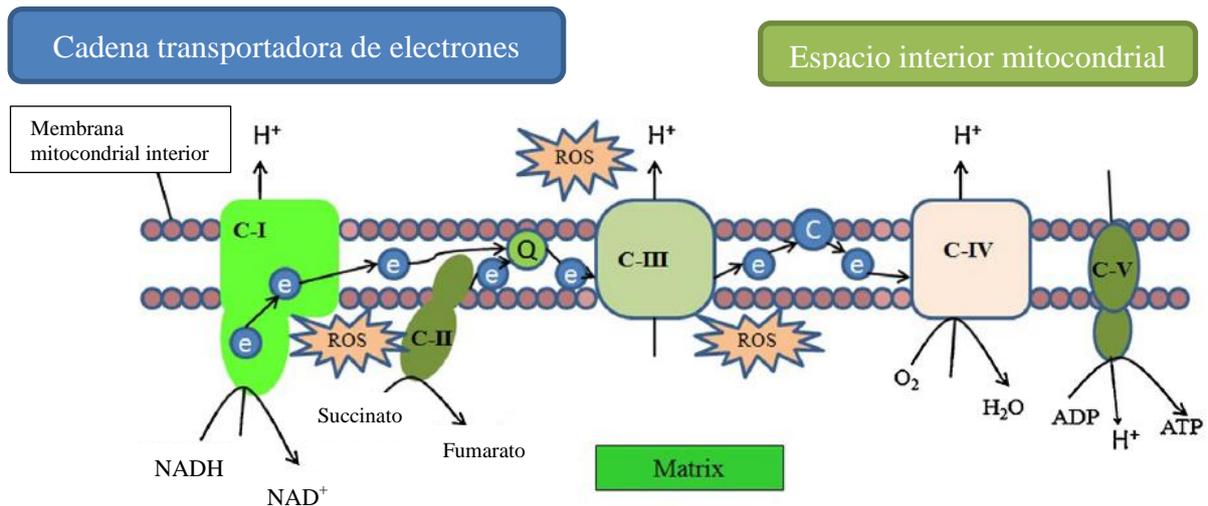


Figura 1. La cadena transportadora de electrones y la formación de ERO en los complejos I y III⁵

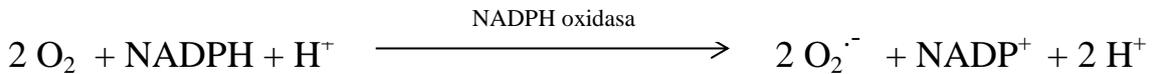
Anión superóxido

Estos electrones desapareados de los radicales libres usualmente tienen un grado de reactividad muy elevado. El tipo más importante de radical libre generado en organismos vivos son los radicales derivados del oxígeno. La molécula de oxígeno tiene una configuración electrónica única y la adición de un electrón a la molécula de O_2 forma el anión radical O_2^- conocido como radical superóxido. Dicho radical surge ya sea de procesos metabólicos o siguiendo la activación del oxígeno por irradiación física, por lo que se le considera el ERO primario y puede interactuar con otras moléculas para generar ERO secundarios, ya sea de forma directa o prevalentemente de forma enzimática o procesos catalizados por metales.⁴

El oxígeno utilizado por los organismos aeróbicos se reduce hasta agua mediante el sistema de transporte de electrones y se considera que alrededor del 1-2% del oxígeno que se consume en la respiración mitocondrial escapa en forma de anión superóxido.

Quizá la fuente más importante de radicales superóxido in vivo es la descarga o estallido respiratorio (aumento súbito del consumo de oxígeno) de las células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y

monocitos) activadas por diversos factores químicos y biológicos. En la membrana citoplasmática de estas células se encuentra un complejo enzimático denominado NADPH oxidasa que cataliza la siguiente reacción:



Esta reacción es esencial para la destrucción del material fagocitado, aunque en ocasiones una activación excesiva de los fagocitos puede producir daño tisular. Por otro lado, numerosas enzimas localizadas en el citosol, mitocondria, peroxisomas y en la membrana plasmática generan radicales libres durante su ciclo catalítico; por ejemplo la enzima xantina oxidasa, presente en diversos tejidos incluyendo al endotelial y al renal, produce anión superóxido cuando reduce O_2 a H_2O durante el catabolismo de las bases púricas.³

Producción de anión superóxido por organelo

Mitocondrias.	<ul style="list-style-type: none"> • Por la oxidación de la semiquinona de la flavina de la NADH deshidrogenasa • Por la oxidación de la semiquinona de la ubiquinona
Retículo endoplásmico	<ul style="list-style-type: none"> • A través del citocromo P450 y de la flavoproteína NADPH – citocromo P450 reductasa
Citosol	<ul style="list-style-type: none"> • Por acción de la enzima xantina oxidasa

Peróxido de hidrógeno

El H_2O_2 se forma por dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$ que es catalizada por la enzima superóxido dismutasa (SOD); en medio acuoso el $\text{O}_2^{\cdot-}$ se dismuta de manera espontánea generando peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular.



El peróxido de hidrógeno puede difundir a través de las membranas celulares al espacio extracelular donde existen pocos mecanismos de defensa antioxidante, y participar en la formación de radicales hidroxilo. El peróxido de hidrogeno tiene una gran importancia en la biología, ya que en presencia de metales de transición como el Cu^+ o Fe^{2+} da lugar a la reacción de Fenton con la producción de radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$).³



Al reaccionar el radical superóxido con el peróxido de hidrógeno se produce el radical hidroxilo a través de la reacción Haber – Weiss.



Producción de H_2O_2 por organelo

Mitocondria	<ul style="list-style-type: none"> A partir de la dismutación del $\text{O}_2^{\cdot-}$, catalizada por la superóxido dismutasa.
Retículo endoplásmico	<ul style="list-style-type: none"> Por la autooxidación del citocromo P450 (FMNH_2) de la citocromo c NADPH reductasa.
Peroxisomas	<ul style="list-style-type: none"> En este organelo se encuentran diferentes proteínas que pueden dar origen al H_2O_2 como lo son: la urato oxidasa, la 1-α-hidroxiácido oxidasa y la D-aminoácido oxidasa

Radical hidroxilo $\text{OH}\cdot$

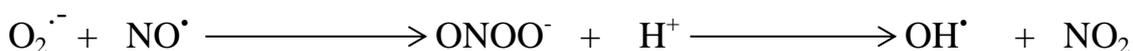
La coexistencia de $\text{O}_2^{\cdot-}$ y H_2O_2 en un modelo biológico que inevitablemente contiene hierro o cobre, es muy peligrosa pues favorece la formación del radical $\text{OH}\cdot$, el cual es un oxidante en extremo reactivo que interacciona con diversas biomoléculas a velocidades solo limitadas por su difusión, y entre otros productos da lugar a una siguiente generación de radicales libres provenientes de las moléculas con que reaccionó.³

Aunque los iones hierro que se encuentran en la transferrina y lactoferrina a pH fisiológico y condiciones normales no participan de la producción de radicales libres, el hierro que se encuentra en la ferritina pueda ser

movilizado por moléculas reductoras como el superóxido o el ascorbato y catalizar la formación del radical hidroxilo en el estrés oxidativo.

El radical hidroxilo posee una alta reactividad y una vida media bastante corta debido a que reacciona de manera rápida e inespecífica con los blancos celulares más cercanos (ADN, proteínas, lípidos y carbohidratos).

En otra interacción biológica importante el $O_2^{\cdot-}$ puede reaccionar con el óxido nítrico NO^{\cdot} , que es un radical libre del nitrógeno y producir peroxinitrito ($ONOO^-$), el cuál al hidrolizarse se escinde en dos moléculas: una de radical hidroxilo y una de bióxido de nitrógeno.



Las células no cuentan con sistemas enzimáticos que pueden utilizar el radical hidroxilo como sustrato, pero si los que previenen su formación. Tiene una capacidad superior a las demás especies reactivas del oxígeno de causar daño a nivel celular, debido a que las células no cuentan con un sistema enzimático antioxidante contra este radical.³

Singulete del oxígeno O_2^*

Se forma cuando uno de los 2 electrones libres del oxígeno capta energía y modifica su giro y se aparea de inmediato con el otro electrón libre pero en diferente orbital (Py y Pz). Es formado en la fagocitosis (mieloperoxidasas) y reacciones catalizadas por peroxidasas. Los fagocitos contienen la enzima mieloperoxidasa, hemoproteína que en los mamíferos pertenece a la familia de las peroxidasas. Es la proteína más abundante de los neutrófilos, en los que ayuda durante el estallido respiratorio y cuyas funciones son: halogenación y lipoperoxidacion; en la primera, esta enzima cataliza la formación del ácido hipocloroso, que es un importante agente bactericida reactivo ante diferentes moléculas incluyendo los grupos amino libres (RNH_2) para formar una cloramina.

El singulete del oxígeno es capaz de modificar diferentes biomoléculas como el ADN y causar daños en las proteínas a través de la oxidación de ciertos grupos esenciales de aminoácidos entre los cuales se encuentran; triptófano, metionina, histidina y residuos de cisteína. Posee una vida media corta de aproximadamente 0.5 microsegundos. Se caracteriza por que en su estado molecular no tiene restricción en la transferencia de electrones, por tal motivo es altamente reactivo. De igual forma, da inicio a la lipoperoxidación generando radicales como el alcoxilo ($RO\cdot$) y peroxilo ($ROO\cdot$).

En conclusión se considera que el aumento del consumo de oxígeno en el estallido respiratorio de los fagocitos tiene una función de producir una gran cantidad de metabolitos del oxígeno, como el anión superóxido, el radical hidroxilo, el peróxido de hidrógeno, y el singulete de oxígeno, que tienen poder bactericida.

Reacciones de los radicales libres

Una vez que los radicales libres son formados, buscan el modo de conseguir una configuración electrónica estable, razón por la cual interactúan con otras moléculas a través de reacciones de óxido reducción (redox). En dichas circunstancias, hay una transferencia de electrones que necesariamente implican la reducción (ganancia de electrones) y oxidación (pérdida de electrones) de las moléculas participantes. Dicho mecanismo genera que la producción de radicales libres sea una reacción en cadena, ya que al reaccionar un radical libre con una molécula o radical inevitablemente esta última pasa a ser un radical libre. Dicha reacción en cadena solamente se detendrá cuando dos radicales libres se encuentren y reaccionen entre sí.

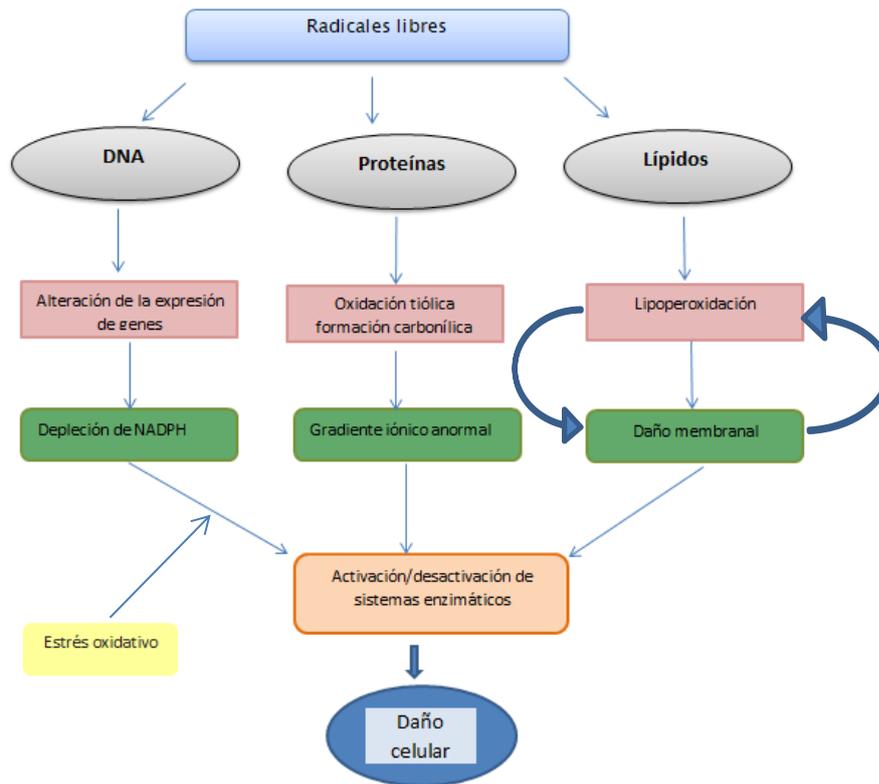


Figura 2. Esquema muestra una representación del efecto de los radicales libres sobre proteínas, DNA y lípidos. Los radicales libres reaccionan con las membranas de los lípidos, también con las proteínas y ácidos nucleicos causando daño celular ⁵

Biomarcadores de estrés oxidativo

Sulfhidrilos totales

Los tioles comprenden la mayor porción de la capacidad antioxidante total y sus grupos sulfhidrilo juegan un rol muy importante en el balance redox. Interconversiones dinámicas y reversibles entre tioles (su forma reducida) y disulfuros (la forma oxidada) comprenden dicho balance.⁶

El método utilizado para la determinación de sulfhidrilos ocupa una de las dos principales propiedades del grupo tiol (SH), es decir su capacidad de oxidarse o substituirse.

Los grupos sulfhidrilo totales se determinan mediante el reactivo de Ellman, el cual modifica los tioles libres en las proteínas, formándose puentes disulfuro con el tiol y liberando el tiolato, el cual da un color amarillo en medio alcalino y se puede medir su absorbancia a 412 nm.⁷

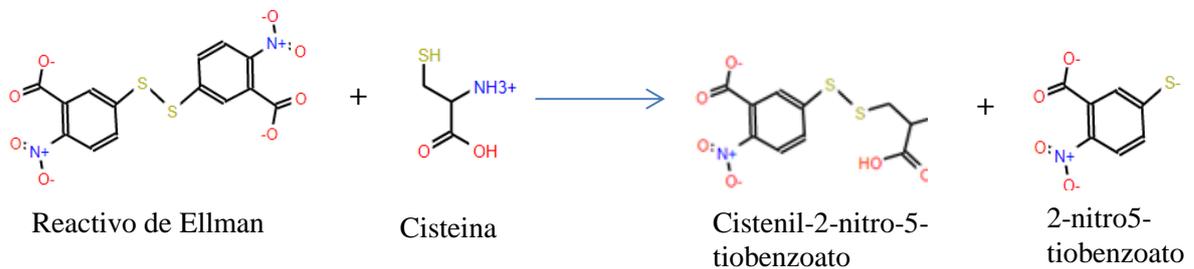


Figura 3. Esquematización de la determinación de tioles

Capacidad antioxidante total

Cuando las defensas naturales del organismo (enzimáticas, no enzimáticas y dietarias) son sobrecargadas con una cantidad excesiva de especies reactivas del oxígeno ocurre el estrés oxidativo resultando en daño a proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Los sistemas han desarrollado complejos sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (enzimáticos); así como la albumina, ceruloplasmina, ferritina, ácido ascórbico, glutatión, alfa tocoferol, ácido úrico (no

enzimáticos). El método CUPRAC (cupric reducing antioxidant capacity) diseñado por Mustafa y cols. Se basa en la medición de la absorbancia del quelato Cu (I) neocuproína formado como resultado de la reacción redox del rompimiento en cadena de antioxidantes con el reactivo de CUPRAC (Cu (II) Neocuproína).⁸

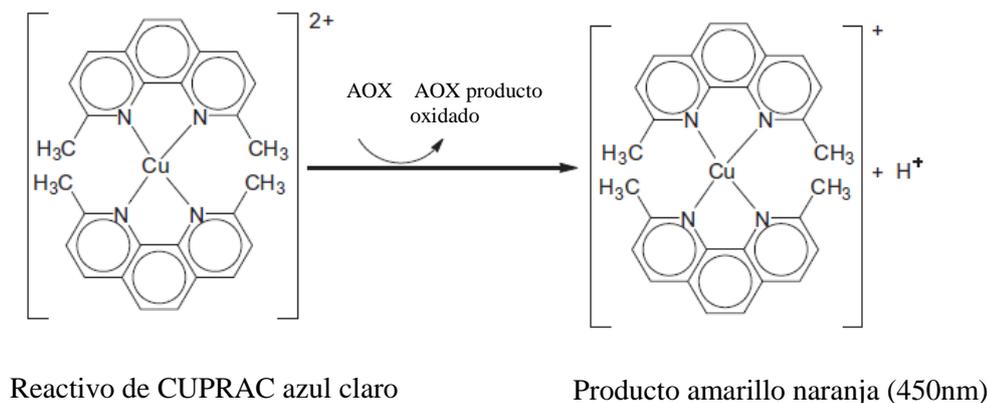


Figura 4. La reacción CUPRAC: catión quelato de bisneocuproína cobre (I). En esta reacción el grupo Aromático Ar-OH de los antioxidantes polifenólicos (AOX) son usualmente oxidados a las respondientes quinonas (Ar=O) y el quelato Cu (II)-Nc es reducido al también quelato Cu(Nc)₂.⁸

Cuantificación de las modificaciones (daño) a proteínas causadas por las reacciones de hidroxilación inducidas por el radical hidroxilo

Los radicales libres producen alteraciones en las lipoproteínas de baja densidad por oxidación, provocando reacciones citotóxicas en las células endoteliales, pérdida del reconocimiento por el receptor concomitante con la consecuente fagocitosis y acumulación de lipoproteínas modificadas en los macrófagos. Los residuos de fenilalanina y de tirosina en las proteínas son susceptibles de hidroxilarse por el radical hidroxilo, formando los productos 3,4 dihidroxifenilalanina unida a la proteína (proteína-DOPA) y sus correspondientes ortoquinonas. El radical hidroxilo puede formarse por radiación, por peroxinitritos, reacción de Fenton e incluso por la autooxidación de la glucosa. La cantidad de proteínas hidroxiladas puede cuantificarse espectrofotométricamente gracias a la capacidad de dichos compuestos para reducir el azul de nitrotetrazolio en formazán.⁹

es un compuesto sólido soluble en agua y debido a sus funcionalidades carbonílicas es un compuesto muy reactivo. Puede polimerizarse fácilmente y sufre de varias reacciones donde se involucran centros nucleofílicos de diferentes biomoléculas incluidas el ADN y restos de aminoácidos de las proteínas. MDA se considera como un biomarcador de estrés oxidativo pero también de importancia fisiológica y patológica.¹²

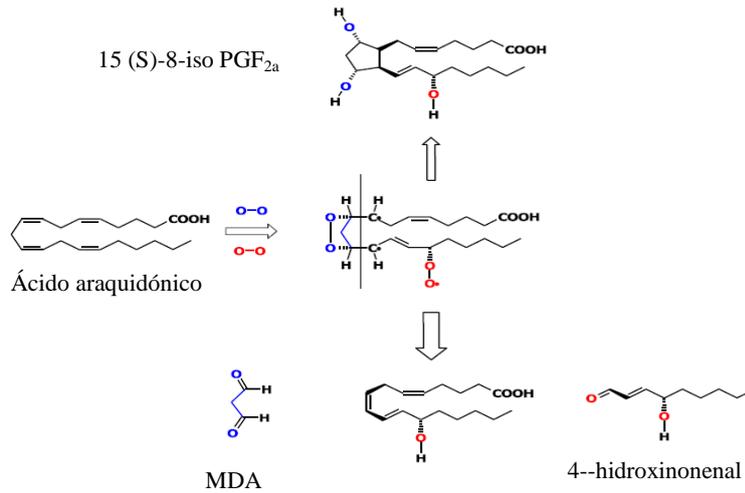


Figura 7. Mecanismo simplificado para la formación de MDA, 4-hidroxi-2-nonenal y 15(S)-8-iso-PGF_{2a} por la peroxidación catalizada por COX del ácido araquidónico¹²

Entre la variedad de métodos analíticos desarrollados para determinar el daño oxidativo de los lípidos, el más comúnmente utilizado se basa en la reacción del malondialdehído con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) para formar aductos cromógenos y fluorescentes de MDA-TBA muy estables y que se pueden cuantificar por espectrofotometría de absorción visible bajo condiciones ácidas y temperatura ambiente, 1-metil-2-fenilindol reacciona con malondialdehído (MDA) para producir un cromóforo estable¹³

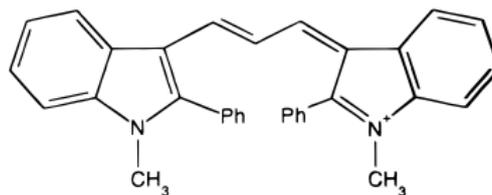


Figura 8. Estructura formada del cromóforo obtenido en la reacción de MDA con metilfenilindol¹³

basal *per se* en la circulación sanguínea debido a su corta vida media (<0.1 s), ya que este se transforma a través de una serie de reacciones con diferentes tipos de biomoléculas. Sin embargo existen diferentes formas de almacenaje de NO en tejidos de mamíferos que han sido postulados, uno de ellos son los nitratos y nitritos. Se ha establecido que existe una alta relación entre la producción endógena de óxido nítrico y los niveles plasmáticos de nitratos y nitritos por lo que la medición de estos niveles provee de una estimación confiable de los niveles de óxido nítrico in vivo.

La reacción de Griess describe la formación de un cromóforo proveniente de la diazotación de la sulfanilamida por el nitrito ácido, seguida de un acoplamiento de aminas bicyclicas como la N-1-(naftiletilendiamina) (NEDD). La desventaja de esta técnica es que solo detecta a los nitritos y no a los nitratos por lo que es necesario realizar una reducción de dichos nitratos con VCl_3 . Ya formada la sal de diazonio se determinara su concentración espectrofotométricamente a 543 nm. ¹⁵

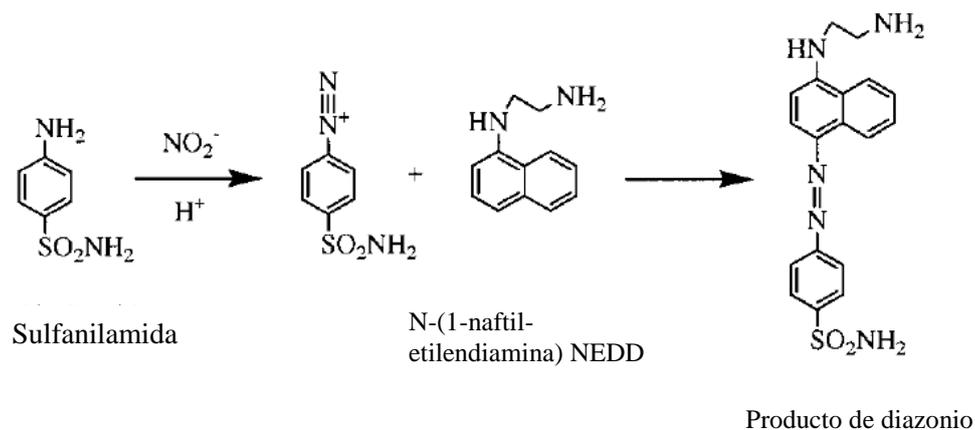


Figura 10. Esquemización de la reacción de Griess¹⁵

Actividad de la enzima S -Nitrosoglutación reductasa

Se ha informado que existe evidencia que indica que la biología del óxido nítrico (NO) involucra a una familia de moléculas relacionadas estrechamente con él, y esas son los S-nitrosotioles (SNOs). Dichas moléculas son fundamentales en la transducción de las defensas del cuerpo. Sin embargo, también se sabe que las mismas células “apagan” las señales

o se protegen ellas mismas de los SNOs producidos con propósitos de defensa.¹⁶

Los SNOs también tienen la función de estabilizar la bioactividad del óxido nítrico y contribuir al flujo sanguíneo y la distribución del oxígeno. Dentro de la estructura de un SNOs el grupo nitroso se une covalentemente con el grupo sulfhidrilo residual de proteínas de bajo peso molecular. Químicamente los S-nitrosotioles son tioesteres de nitrito con una similar analogía con los nitrito ester de alcoholes. La evidencia muestra que los SNOs tienen muchas de las actividades biológicas del mismo NO (relajación venosa y de músculo liso, inhibición de la agregación de plaquetas etc.) por activación de la guanilil ciclasa. Como los SNOs son relativamente estables y liberan NO en diferentes condiciones, son consideradas como un sistema buffer que controla funciones intra y extracelulares del NO incrementando su rango de acciones en términos de tiempo y espacio.¹⁷

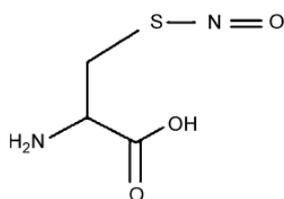


Figura 11. S-nitrosocisteína, el S-nitrosotiol más simple y con menor peso molecular¹⁷

La actividad de GSNO reductasa se midió espectrofotométricamente de acuerdo a Liu L.¹⁶ en amortiguador Tris-EDTA (Tris 50 mM-EDTA 0.5 mM, pH 8.0), conteniendo NADH 0.2 mM y el sustrato GSNO 0.2 mM, midiendo la oxidación del NADH a 340 nm. Debido a que el GSNO también absorbe a 340 nm, el coeficiente de absorción que se usó en los cálculos de la actividad fue de 7.06 mM⁻¹, el cual es la suma de las absorciones del NADH ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}$) y del GSNO ($\epsilon = 0.84 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), de acuerdo a Jensen¹⁸.

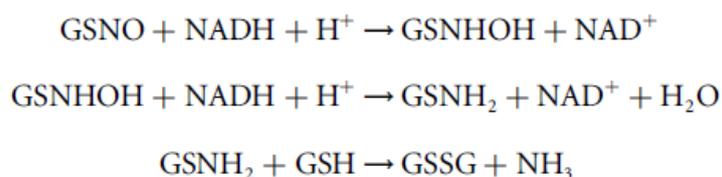


Figura 12. Reacciones ocurridas en la medición de la actividad de la enzima GSNO reductasa¹⁶

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry.

El método de Lowry (1951) es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se añade un reactivo que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. Este método consta de dos etapas: 1) Los iones Cu^{2+} , en medio alcalino, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu^{2+} -proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. El Cu^{2+} se mantiene en solución alcalina en forma de su complejo con tartrato. 2) La reducción, también en medio básico, del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina, presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.¹⁹

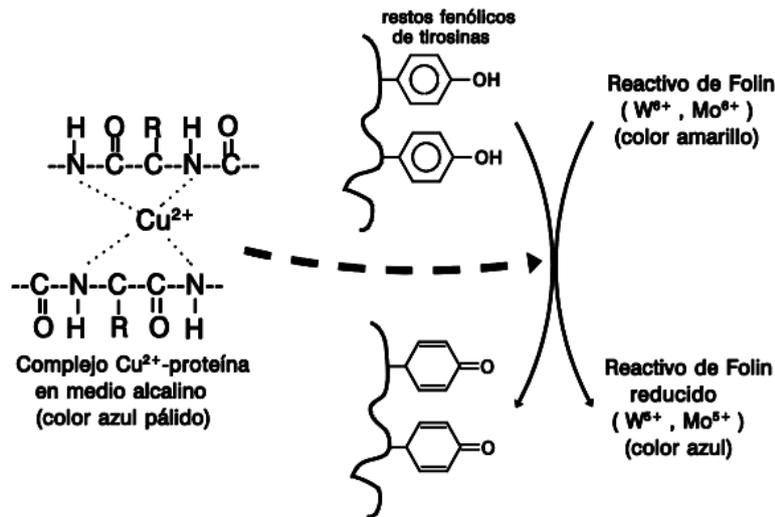


Figura 13. Reacción del reactivo de folin con grupos fenólicos de las proteínas¹⁹

Sistemas de defensa antioxidante

El sistema de defensa antioxidante está constituido por un grupo de sustancias que al estar presente en concentraciones bajas con respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen significativamente la oxidación de este. Como sustrato oxidable se pueden considerar casi todas las moléculas orgánicas o inorgánicas que se encuentran en las células vivas, como proteínas, lípidos, hidratos de carbono y las moléculas de ADN. Los antioxidantes impiden que otras moléculas se unan al oxígeno, al reaccionar-interactuar más rápido con los radicales libres del oxígeno y las especies reactivas del oxígeno que con el resto de las moléculas presentes, en un determinado microambiente -membrana plasmática, citosol, núcleo o líquido extracelular. La acción del antioxidante es de sacrificio de su propia integridad molecular para evitar alteraciones de moléculas (lípidos, proteínas, ADN, etc.) funcionalmente vital o más importante. Su acción la realizan tanto en medios hidrofílicos como hidrofóbicos y actúan como eliminadoras (scavengers), con el objetivo de mantener el equilibrio prooxidante/antioxidante a favor de estos últimos. Los antioxidantes exógenos actúan como moléculas suicidas, ya que se oxidan al neutralizar al radical libre, por lo que la reposición de ellos debe ser continua, mediante la ingestión de los nutrientes que los contienen.²⁰

Un antioxidante con función biológica es una sustancia que incluso en concentraciones muy pequeñas comparadas con las de un sustrato oxidable, disminuye o evita la oxidación del sustrato toda vez que resulta un agente reductor más potente. Puede considerarse como un donador de electrones capaz de evitar una reacción en cadena de oxidoreducción. Se han clasificado de diferentes maneras, pero la más utilizada es la que establece las diferencias según la estructura química y función biológica, dividiéndose entre enzimáticos y no enzimáticos.³

Intracelular	Membrana	Extracelular
Superóxido dismutasa	Vitamina E	Ceruloplasmina
Catalasa	Betacarotenos	Transferinas
Peroxidasa	Ubiquinol 10	Lactoferinas
Glutati6n reducido GSH		Albuminas
Proteínas que ligan metales		Haptoglobinas
Sistemas proteolíticos		Vitamina C
Vitamina C		Ácido úrico
		Vitamina E

Tabla 1. Clasificación de los antioxidantes según el sitio donde ejercen su acción²⁰

Antioxidantes enzimáticos

Las defensas antioxidantes consisten en evitar la reducción del oxígeno, mediante sistemas enzimáticos capaces de efectuar esa reacción. Un ejemplo es la eficiente reducción tetravalente y consecutiva en la que no se liberan intermediarios. Este proceso se lleva a cabo en el sistema citocromo oxidasa, que reduce más del 90% del oxígeno en el organismo humano.

Se han descrito un grupo de enzimas especializadas en inactivar las ERO por diferentes mecanismos, entre otras, las superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y las glutati6n peroxidasas (GSHPx).

a) Súper oxido dismutasa.

Las isoenzimas de SOD son metaloenzimas que catalizan la dismutación del anión superóxido para producir oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno. En mamíferos se han identificado 3 isoenzimas de la SOD, productos de genes nucleares diferentes: una contiene Cobre y Zinc (CuZnSOD) y se localiza principalmente en el citoplasma de eucariotas; la SOD que tiene manganeso (MnSOD) en su composición, se encuentra en las mitocondrias; mientras que la isoenzima extracelular (ECSOD) que también contiene cobre y zinc en su sitio activo, se localiza en 99% en los espacios extracelulares.

La SOD que se considera una enzima desintoxicante eficiente, ya que el producto de su actividad catalítica, que es el H_2O_2 es un agente tóxico. Sin embargo, la dismutación del $O_2^{\cdot-}$ es el primer paso de la cascada enzimática que conduce a la inactivación completa del $O_2^{\cdot-}$ formado. El segundo paso depende de la catalasa.

b) Catalasa

Esta enzima antioxidante induce la transformación de H_2O_2 en agua. En mamíferos esta enzima está presente en altas concentraciones en el hígado y riñón y en bajas cantidades en tejido conjuntivo. En las células la catalasa se ha localizado en el citosol, las mitocondrias y organelos subcelulares, como los peroxisomas, mientras que en los eritrocitos se presenta en una forma soluble.

c) Glutatión peroxidasa

Encargadas de la reducción del peróxido de hidrógeno por diversos donadores de electrones. Hasta ahora se han identificado cuatro tipos de GSHPx dependientes de selenio.

1. La isoenzima citosólica (cGSHPx) es la selenoproteína más abundante en la rata y está presente en todos los tejidos. Su función es almacenar el oligoelemento cuando están presentes

cantidades elevadas de peróxido de hidrógeno o hidroperóxidos asociados a lípidos que son producidos en el citosol.

2. La enzima plasmática (p1GSHPx) es responsable de la actividad de peroxidasa en el plasma y se considera que representa a un participante fundamental en el sistema de defensa antioxidante del plasma.
3. El mRNA de la isoenzima gastrointestinal (glGSHPx) se ha encontrado solo en hígado y colon humano. La localización de esta isoenzima de glutatión peroxidasa sugiere que participa en la protección contra los efectos adversos de los hidroperóxidos de la dieta.
4. La isoenzima asociada a fosfolípidos (PLGSH Px) es abundante en el tejido testicular y al parecer, su actividad es regulada por β gonadotropinas. Presenta además un sitio de fosforilación relacionado con la regulación de la actividad de la enzima.

Al catalizar la reducción de peróxido de hidrógeno las cuatro isoenzimas utilizan al glutatión reducido (GSH) por la reacción, dando lugar a la formación concertada de glutatión oxidado (GSSG) el cual puede recuperar su estado reducido y funcionar como sustrato de la enzima glutatión reductasa que en presencia de NADPH impide que se agoten las reservas de GSH.³

Antioxidantes no enzimáticos

Entre ellos destacan:

- a) Vitamina E

Conformada por la mezcla de cuatro tocoferoles (α , β , γ y δ) de los cuales el d- α representa el 90% del total. Esta molécula se considera el principal antioxidante liposoluble y se encuentra tanto en el plasma vinculado con los lípidos circulantes como en

las membranas celulares. Es importante tomar en cuenta que existe una capacidad de saturación membranal, la cual está en equilibrio con la concentración libre o plasmática, por lo que el intento por mejorar la eficiencia antioxidante en los individuos, apoyada en los suplementos orales y que utiliza dosis farmacológicas variables (100- 2800 UI), no modifica la eficiencia antioxidante de un individuo, debido a que se excede el efecto óptimo posible al sobrepasar la saturación de las membranas. Este protege contra la lipoperoxidación, pues actúa de manera directa con varios radicales entre los que se incluyen el OH^\cdot , el radical peroxilo, el triclorometilo (proveniente del tetracloruro de carbono CCl_4), así como el anión superóxido. El singulete también reacciona con el tocoferol, a pesar de tener una vida media breve. Es efectiva como agente antioxidante, convirtiendo al OH^\cdot y a los radicales lipoperóxido en moléculas menos reactivas. La molécula del α tocoferol es muy eficiente como agente interruptor de la cadena de peroxidación debido a la formación de radical tocoperoxilo que es relativamente estable y no reacciona con sustratos lípidos. Recupera su forma estable al ser reducida por ascorbato y tal vez por la actividad externa redox de las moléculas que constituyen el par ascorbato-glutación-SH de la membrana.

b) Vitamina C

Entre los agentes antioxidantes hidrosolubles la vitamina C es el primero que destaca, es una molécula disponible en todos los compartimientos del organismo; además puede participar como agente estabilizador del radical libre, al funcionar como reductor monoelectrónica (scavenger) de los radicales O_2^\cdot y OH^\cdot , modificando su estado redox al formar el radical libre semideshidroascorbato, que después es oxidado a deshidroascorbato por la reducción e inactivación de otro anión superóxido. El ciclo del glutatión es uno de los procesos esenciales en la defensa antioxidante del organismo, y también uno de los afectados en el estrés oxidante. La vitamina C suprime la inactivación de antiproteasas por oxidantes generados por el

sistema haluro-mieloperoxidasa del neutrófilo, y ejerce una inactivación dosis-dependiente de los oxidantes extracelulares liberados por el neutrófilo. A pesar de las características antes mencionadas la vitamina C no es considerada como el antioxidante ideal debido a que puede presentar propiedades prooxidantes; ya que es probablemente el único agente reductor de la célula que en presencia de O_2^- (al que reduce formando H_2O_2) es capaz de reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} el cual a su vez puede reaccionar con H_2O_2 por medio de la reacción de Fenton y dar lugar al radical más reactivo: el $OH\cdot$. Para que esto ocurra se requieren dos condiciones una es la disposición de Fe en los tejidos y en circulación, debido a la hemólisis o a la ingestión de hierro como suplemento alimenticio (polivitamínico). El otro factor es la automedicación de vitamina C en individuos cuya dieta cumpla con los requerimientos diarios establecidos.

c) Glutatión reducido (GSH)

El tripéptido (γ -glu-cys-gly) glutatión se sintetiza continuamente dentro de la célula y se degrada fuera de ella. La cisteína central de la molecula proporciona el grupo tiol (SH). Es la molecula no proteica que presenta el grupo tiol más más abundante en los tejidos y fluidos biológicos; se mantiene en una concentración milimolar que es particularmente alta en el cristalino, en los eritrocitos de los mamíferos y en los cloroplastos de las plantas.

El glutatión tiene varias funciones:

1. La participación en la formación y rotura de los puentes de disulfuro de las proteínas.
2. La participación de la reducción catalítica del peróxido de hidrógeno por la acción de la glutatión peroxidasa.
3. La interacción directa con los radicales O_2^- y $OH\cdot$; alcoxilo y peroxilo, dando lugar a la formación del radical glutatilo ($GS\cdot$) y en ocasiones al dímero de glutatión oxidado. (GSSG), mediante una transferencia de radicales. En cuanto a la posibilidad de considerar al glutatión como suplemento

nutricional atractivo, hay que tomar en cuenta que se trata de un tripéptido y su administración oral es inútil. Como alternativa, se ha considerado que la administración de N-acetil-cisteína representa ventajas ya que es una molécula que proporciona grupos SH libres sin ser incorporada a las proteínas.

Las moléculas que presentan grupos tiol como la cisteína, la homo cisteína, la cisteamina y la N-acetil-cisteína, son donadores de electrones capaces de participar en reacciones monoelectrónicas, proceso mediante el cual funcionan como inactivadores de radicales libres (scavengers), permitiendo que estos obtengan estabilidad electrónica y dejen de ser libres.

d) β caroteno

Es un pigmento antioxidante casi en todas las plantas y también es precursor de la vitamina A. El beta caroteno es la molécula que reacciona con mayor eficacia con el singulete de oxígeno. La vitamina A no interacciona con el singulete de oxígeno y carece de actividad para la depuración de los radicales libres.

e) Ácido úrico

Formado durante el catabolismo de las purinas tiene propiedades antioxidantes importantes, incluso a concentraciones fisiológicas en el plasma humano. El urato inactiva directamente al $\text{OH}\cdot$, singulete de oxígeno, grupos oxidantes oxo-hemo formados por la reacción entre peróxidos y la hemoglobina, y radicales peroxilo de la lipoperoxidación. Además, el ácido úrico previene la oxidación de la vitamina C y se une a los metales de transición (Fe), impidiendo su actividad inductora de las reacciones redox. El ácido úrico participa en estas como un antioxidante de sacrificio ya que es hidrolizado de manera irreversible. Otra función importante es la de ser un depurador del radical peroxinitrito (ONOO^-).

f) Glucosa

Entre las moléculas hidrosolubles con capacidad antioxidante demostrada se incluye la glucosa que inactiva al radical $\text{OH}\cdot$ con una eficiencia similar al manitol, sin embargo se debe tener en cuenta que durante el metabolismo aeróbico de la glucosa y por reacciones adicionales como su autooxidación ella misma contribuye a la generación de diferentes ERO proceso que se aumenta en los pacientes diabéticos con hiperglucemia .

Los antioxidantes pueden también clasificarse por su mecanismo de acción en primarios (preventivos) y secundarios (interruptores). Los primeros actúan al principio de una reacción de oxidación en cadena con el fin de que inicie la secuencia de reacciones de óxido reducción. Algunos ejemplos son los agentes antioxidantes no enzimáticos y las enzimas reductoras de peróxidos orgánicos e inorgánicos (superoxidodismutasa, glutatiónpoxidasa, catalasa y peroxidasa). Los secundarios son eficientes para detener o bloquear en alguna etapa la ración de oxidación ya iniciada, pero que continúa como una reacción química en cadena (lipoperoxidación). Estos antioxidantes reducen a los radicales orgánicos y en algunos casos hidrolizan a los grupos funcionales generados durante la lipoperoxidación, como los hidroperóxidos que son hidrolizados por la paraoxonasa.

Una tercera forma de clasificar a los agentes oxidantes es en endógenos y exógenos. Los primeros son moléculas sintetizadas y formadas por el organismo como el GSH, el ácido úrico y las enzimas antioxidantes (SOD, CAT, GSH-Px, entre otras). En cambio los exógenos son moléculas que el humano no sintetiza y se deben obtener de fuentes externas como la vitamina C y E, el β caroteno, la glucosa y algunos oligoelementos como el selenio y el cinc, que aunque no son antioxidantes se les clasifica como tales porque funcionan como cofactores de las enzimas antioxidantes.

Finalmente conviene considerar el concepto de capacidad antioxidante del plasma, que es la suma de los mecanismos antioxidantes y presentes en un organismo. Es el grado de defensa del organismo para impedir el daño por

las ERO y representa la eficiencia para inactivar y depurar los radicales libres de oxígeno de diferente origen. En medicina se empieza a tomar en cuenta como un parámetro adicional y complementario para la estimación del riesgo quirúrgico, evolución y pronóstico en algunos padecimientos.³

Origen	Acción
Exógenos	
<ul style="list-style-type: none"> • Vitamina E 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutraliza el singulete del O₂* • Captura radicales hidroxilo • Neutraliza peróxidos
<ul style="list-style-type: none"> • Vitamina C 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutraliza el singulete del O₂* • Captura radicales hidroxilo • Regenera la forma oxidada de la vitamina E
<ul style="list-style-type: none"> • Betacarotenos, licopenos y flavonoides 	<ul style="list-style-type: none"> • Neutraliza el oxígeno singulete
Endógenos	
Enzimáticos	
<ul style="list-style-type: none"> • Superóxido dismutasa SOD 	<ul style="list-style-type: none"> • Cofactor sodio, manganeso, cobre
<ul style="list-style-type: none"> • Catalasa CAT 	<ul style="list-style-type: none"> • Hierro
<ul style="list-style-type: none"> • Glutación peroxidasa GPx 	<ul style="list-style-type: none"> • Selenio
No enzimáticos	
<ul style="list-style-type: none"> • Glutación 	<ul style="list-style-type: none"> • Barrera fisiológica que enfrenta el oxígeno a su paso desde el aire hasta las células
<ul style="list-style-type: none"> • Coenzima Q 	
<ul style="list-style-type: none"> • Ácido tioctico 	<ul style="list-style-type: none"> • Transportadores de metales transferrina y ceruloplasmina

Tabla 2. Origen y acción de los antioxidantes.²⁰

El Óxido nítrico y su implicación fisiológica

El óxido nítrico es una molécula pequeña que contiene un par de electrones desapareados y es un radical libre. Se genera en tejidos biológicos por enzimas especializadas llamadas óxido nítrico sintasas, las cuales metabolizan arginina a citrulina con la formación de óxido nítrico por una vía oxidativa de 5 electrones. El óxido nítrico es un radical reactivo que actúa como un importante señalizador oxidativo biológico en una gran variedad de procesos fisiológicos como neurotransmisión, mecanismos de defensa, relajación de músculo liso, regulación de la tensión arterial y regulación inmunitaria.⁴

El óxido nítrico fue descubierto en 1770 por Joseph Priestly, un Químico y teólogo inglés, pero fue descartado para propósitos médicos basados en la creencia de que este gas era solamente un componente de la contaminación atmosférica. La información cardiovascular comenzó a reportar los beneficios del óxido nítrico en la enfermedad de la angina de pecho y la isquemia reversa. En 1992, el NO fue reconocido por la ciencia como molécula del año. Por su función innovadora “como una molécula señalizadora en el Sistema cardiovascular”.

El Doctor Furchgott, Ignarro y Murad fueron galardonados con el premio Nobel de medicina y fisiología en 1998. Su trabajo ayudó a establecer la fundación del presente entendimiento del rol crítico del NO en el cuerpo y ahora se reconoce a esta molécula como el factor relajante derivado del endotelio (EDRF por sus siglas en inglés) y como un potente vasodilatador que impacta numerosos sistemas en el cuerpo.^{3,17}

Existen 3 óxido nítrico sintasas (NOS) que producen NO en el cuerpo, las cuales son codificadas por diferentes genes: neuronal NOS1, la inducible NOS2 y la endotelial NOS3. De forma directa el NO activa la guanilil ciclasa soluble para producir guanosina monofosfato cíclica (cGMP). Indirectamente los niveles elevados de NO pueden producir especies reactivas de oxígeno y llegar a niveles citotóxicos.

La NOS, una enzima intracelular del citocromo p450, oxida a la L-arginina a L-hidroxiarginina, NO y citrulina. Además de la función

vasodilatadora, eNOS juega un importante rol en la mediación del factor vascular endotelial (VEGF-inducido), la permeabilidad vascular y la angiogénesis. iNOS y nNOS sirven como factores importantes inmunitarios y de neurotransmisión.³

Debido a sus únicas propiedades gaseosas, el NO generado difunde intracelularmente a través de la membrana de forma muy rápida para llegar a tejidos diana. Dichos tejidos diana responden activando a la enzima guanilato ciclasa y generando GMP cíclico. Esta cascada produce en su paso final la relajación del musculo liso. También está involucrado en la vasodilatación del musculo liso en el sistema cardiovascular, urogenital, respiratorio, gastrointestinal e incluso en el sistema inmune, tiene un papel en la angiogénesis, agregación plaquetaria y el Sistema musculo esquelético con la regulación de la formación del hueso. Tiene una función doble en el proceso inflamatorio, ya sea con una baja cantidad de NO o con un alta cantidad puede conducir a un proceso patológico.²¹

La NOS neuronal y la NOS endotelial difieren de la iNOS en que ellas están fuertemente reguladas por la activación de calcio calmodulina, la fosforilación específica, la interacción con los receptores membranales ionotrópicos o la compartimentalización en caveolas. Esta fuerte regulación hace que las NOS neuronales o endoteliales sean las ideales para generar NO como una molecula señalizadora que puede regular procesos fisiológicos como la diferenciación y la plasticidad neuronal en el sistema nervioso. En contraste iNOS es regulada comúnmente por mediadores inflamatorios y produce NO en tanto la molecula este intacta y su substrato (arginina) esté disponible. En todas las enfermedades los niveles de iNOS son incrementados en la microglía o en los astrocitos.³

La eliminación molecular o inhibición farmacológica de iNOS puede reducir la perdida celular en modelos animales (roedores) de accidente cerebrovascular, enfermedad de Parkinson y enfermedad de Huntington. Debido a su fuerte asociación con la neuropatología la regulación de iNOS se ha convertido en sujeto de gran escrutinio. Sin embargo los mecanismos regulatorios intracelulares que apagan la actividad de la enzima iNOS o alternativamente que previenen su activación no están bien entendidos.

Se ha demostrado que los astrocitos transportan L arginina la cual es necesaria para la máxima actividad de iNOS y la generación de NO. Sin embargo aún permanece sin respuesta el por qué la arginina extracelular es requerida por la actividad iNOs, las concentraciones intracelulares de arginina son mucho muy superiores al nivel de la Km y debería ser suficiente para saturar la iNOS. Este fenómeno es conocido como la paradoja de la arginina.²²

S-nitrosotioles y S-nitroso glutatión reductasa

El plasma y el medio celular contienen especies reactivas que pueden inactivar rápidamente al NO libre, en contraste con la relativamente larga vida media de EDRF, por lo que se ha considerado que el NO es estabilizado por una molécula acarreadora que prolonga la vida media y preserva la actividad biológica.

Los S nitrosotioles (RSNOs) han demostrado ser unos potentes relajantes del tejido muscular liso y como inhibidores de la agregación plaquetaria y son los mejores candidatos para el almacenaje endógeno de NO. Algunos de estos compuestos como la S-nitrosoalbumina (BSNO), S-nitroso-L-cisteína(CySNO), y S Nitrosoglutatión (GSNO) se encuentran naturalmente in vivo, y otros como S-nitroso N-acetylpenicilamine, S nitrososcaptopril, y S-nitrosomercaptoetilamina han sido sintetizados.

Los RSNOs son compuestos que espontáneamente liberan NO y pueden ser poderosos terminadores de la cadena de propagación de reacciones, esto por la reacción directa con los radicales ROO[·], produciendo nitroderivados (ROONO) como productos finales así como dímeros.²³

Diferentes agentes reductores como metales de transición, ascorbato, ión superóxido, tioles y la luz directa pueden mediar en la liberación de NO de los RNOS. Algunas enzimas también tienen esta misma actividad: aldehído deshidrogenasa, proteindisulfuro isomerasa, glutamil transferasa y la S nitroso glutatión reductasa (GSNO).¹⁷

Estrés nitrosante

La sobreproducción de las especies reactivas del nitrógeno (ERN) es conocida como estrés nitrosativo, este ocurre cuando la generación de especies reactivas de nitrógeno en un sistema excede la habilidad del sistema para eliminarlas o neutralizarlas. El estrés nitrosativo puede llevar a reacciones de nitrosilación las cuales pueden deteriorar la estructura de las proteínas y así modificar su funcionamiento como en el caso de las modificaciones post translacionales y la oxidación proteica. A su vez el estrés nitrosante puede oxidar a los lípidos y ADN/ARN los cuales son características de muchas enfermedades neurodegenerativas ya que el cerebro es el tejido más susceptible del cuerpo a las especies reactivas.⁴

Generalmente el cerebro es metabólicamente hiperactivo y tiene, además, la menor capacidad para la regeneración celular comparada con otros órganos. Así los efectos de las especies reactivas en este sistema son notables. Evidencias recientes mencionan que los productos de oxidación actúan como biomarcadores en algunas enfermedades neurodegenerativas como lo son los marcadores de la peroxidación de lípidos, 4-hidroxinonal y el malondialdehído. Estos biomarcadores se pueden identificar en la sustancia negra mientras que los biomarcadores de la nitración de las proteínas (cuerpos de Lewy) se identifican en el hipocampo y el neocórtex de pacientes con enfermedad de Parkinson. Los marcadores de la nitración de las proteínas se han encontrado elevados en las mismas regiones junto con niveles elevados de 4 hidroxinonal y malondialdehído en la corteza e hipocampo en pacientes con enfermedad de Alzheimer. Así es posible decir que no hay duda de que las especies reactivas y la mitocondria juegan un importante rol en tejido cerebral y sus diferentes consecuencias.³

El óxido nítrico actúa en procesos neuroendocrinos y del comportamiento en una de 3 formas:

1. Indirectamente como un derivado de eNOS mediando el flujo sanguíneo con la consecuente mediación de las secreciones neuroendocrinas

2. Directamente el NO derivado de la nNOS afecta la función neuronal en el cerebro
3. Hormonalmente el NO proveniente de la nNOS modula la secreción de glándulas endocrinas o activación de ciertas zonas de órganos reproductivos.

Estrés psicológico y estrés oxidativo

El estrés es un término general ocupado por primera vez por el endocrinólogo Hans Selye en 1936 para describir la inadecuada respuesta psicológica de un organismo humano o de otro animal, a una demanda emocional, mental o física, ya sea real o imaginaria. Esta respuesta sigue un patrón de tres etapas que es común en animales conocido como síndrome general de adaptación:

1. *La reacción de alarma*: el cuerpo inicialmente se defiende contra circunstancias adversas por activación del sistema nervioso simpático. Este sistema moviliza al cuerpo para la respuesta de pelea o la huida, lo cual puede ser visto filogenéticamente como una respuesta adaptativa a corto plazo para situaciones de emergencia. En muchos casos el episodio del estrés es llevado a cabo durante el estado de alerta.
2. *El estado de resistencia*: el cuerpo se adapta en cierta medida exitosamente a su estresor.
3. *La fase de agotamiento*: la adaptación del organismo es superada o es perjudicial y ocurre un debilitamiento, se asocia con frecuencia con enfermedades, síndrome de burnout, depresión o incluso muerte.²⁴

El estrés también se puede definir como un conjunto de alteraciones que se producen en el organismo como respuesta física ante los estímulos

repetidos. Esta definición es biológicamente aceptada, sin embargo, es un término que ha sufrido modificaciones a lo largo de la historia. El término proviene del latín “stringere” cuyo significado se asocia con oprimir, apretar o atar, lo que posteriormente daría el significado a la palabra francesa “estrechar”. Entre los siglos XVII y XVIII es usada en inglés “strain” asociándosele a los sentimientos de angustia, sufrimiento y calamidades a consecuencias de una vida difícil, expresado todo en una sola palabra.²⁵⁻²⁹

El eustrés

El estrés puede ser una respuesta biológica adaptativa, que resulta positiva para el organismo, se le conoce como eustrés o estrés positivo. Éste puede llevar a una resolución exitosa ante algunas situaciones de crisis.²⁷

El eustrés nos habla básicamente de una situación donde el individuo puede ser capaz de gestionar con éxito las demandas de su entorno, reforzando las estrategias de afrontamiento, apreciación de la realidad, control y aprendizaje, fortaleciendo habilidades que le permitan sobrevivir. Por lo tanto, el estrés tiene un propósito bien definido, y que evoluciona junto con el hombre para desarrollar la respuesta de “fight-or-flight” que es instintiva, en este contexto no se considera el estrés como algo negativo.^{29, 30}

El distrés

Cuando la respuesta al estrés no logra ser adecuada, puede por el contrario conllevar a un estado negativo aversivo donde el proceso de adaptación no devuelve el estado fisiológico y psicológico normal. Este estado es conocido como distrés o estrés negativo, el cual puede deberse a un estrés severo, prolongado o acumulativo, que causa una desestabilización del mecanismo de regulación que no será suficiente para contener las alteraciones causadas por tal estímulo. Este estado desadaptativo mantendrá las funciones biológicas del organismo abrumadas.³¹

Es decir, si la respuesta al estrés no es satisfactoria, no logra producirse una adaptación lo cual resultará perjudicial al organismo por lo que estaremos hablando de distrés. Por ejemplo, los corticosteroides, se secretan en

situaciones de estrés y son esenciales para la adaptación, pero si se produce una hipersecreción, por una exposición prolongada al estímulo nocivo puede llevar a una disminución inmunitaria pronunciada, entre otros efectos patológicos como podría ser el estrés oxidativo.³²

En la antigüedad, el hombre como especie se enfrentaba a múltiples retos que lo llevaban a peligros que ponían en riesgo su vida. La respuesta ante estas situaciones era vital y los mecanismos que se activaban no han cambiado, pero el estilo de vida que lleva el ser humano ha evolucionado y el hombre ha modificado sus condiciones de vida de forma abrumadora. En nuestros días los estímulos como: reducción de horas de sueño, dificultades económicas, las exigencias laborales, los fenómenos de desintegración y fragmentación social, acontecimientos significativos negativos como, fallecimiento de un ser querido, ruptura de relaciones, desempleo, el anuncio de una enfermedad crónica, etcétera. Representan importantes situaciones que pueden detonar en estrés con una patología compleja donde se genere una desregulación de los sistemas anteriormente mencionados, lo cual podría repercutir en el individuo y finalmente implicar una inadecuada adaptación. Por lo que en lugar de una respuesta instintiva que le salvaría la vida, ahora tendrá que enfrentarse a cambios que pueden llegar a bajar su calidad de vida.³³

Interesantemente se ha descrito que el estrés prolongado puede repercutir en varios niveles fisiológicos que conducirán a enfermedades cardiovasculares y neuroconductuales como la depresión y la ansiedad.³⁴

Ansiedad y depresión por estrés crónico

La ansiedad se trata de una respuesta emocional provocada por un agente desencadenante o agente estresante, interno o externo. La ansiedad, además de ser una respuesta emocional al estrés, puede ser una reacción emocional de alerta ante una amenaza. Puede tornarse patológica cuando se manifiesta como una serie de reacciones desproporcionadas e injustificadas ante un estímulo. Como resultado de ello, el individuo se ve incapaz de enfrentarse a situaciones, lo que trastorna su vida diaria.

Otro desorden a menudo inducido por estrés severo, es la depresión. El Manual Diagnóstico y Estadístico de los trastornos mentales³⁵ define depresión por la presencia de al menos dos síntomas principales: anhedonia, (un decremento en la habilidad para experimentar placer) y humor depresivo que dura como mínimo 2 semanas. La anhedonia es un fenómeno cardinal del desorden depresivo y una condición que puede ser evocada en roedores.³⁶

Estrés perinatal

Podemos sufrir estrés en cualquier etapa del desarrollo de nuestra vida, una de ellas es durante el embarazo. Muchas mujeres durante el embarazo están expuestas a múltiples tensiones: privación económica, estrés laboral, dificultades psicosociales, violencia intrafamiliar y exposición a un medio ambiente inseguro.³⁷ Más aún, una proporción significativa de embarazos no son planeados o deseados. Derivado de lo anterior se genera un alto nivel de estrés o tensión emocional y ansiedad excesiva en la futura madre con efectos negativos para ella y su hijo, impactando negativamente a corto y largo plazo en la vida de ambos.²⁴

Un medio ambiente adverso como el que genera el estrés prenatal puede aumentar el riesgo de desarrollar disfunciones fisiológicas, afectando el crecimiento, el metabolismo, el equilibrio redox, entre otros.^{38, 39} Más aún, el estrés prenatal ejerce profundos efectos sobre el neurodesarrollo e incrementa el riesgo de padecimientos como, depresión mayor, bipolaridad, esquizofrenia y autismo.⁴⁰

Se ha analizado que el estrés materno está relacionado con la restricción del crecimiento intrauterino y por tanto el riesgo de nacimiento prematuro, así como con déficit cognitivo en la vida temprana. Algunos hallazgos sugieren que las dificultades del infante están relacionadas con la salud de la madre.⁴¹ Por lo que, la ansiedad sostenida en la gestante, incrementa el riesgo de problemas de neuroconducta en la infancia, lo cual sugiere que esto podría deberse al efecto directo de la ansiedad de la madre sobre el desarrollo cerebral fetal. Además, condiciones adversas en el periodo

postnatal temprano de la vida (estrés nutricional, separación materna, maltrato, etc.) pueden inducir cambios en el metabolismo, y la conducta; esos efectos podrían ser independientes o no de las exposiciones prenatales⁴²

Programación

Existe una amplia evidencia que destaca al ambiente como modulador en fases tempranas de la vida, es decir durante la edad perinatal, y es considerado como un punto crítico para la salud en la vida futura. Actualmente, se ha estudiado que alteraciones durante esta etapa pueden afectar de forma significativa la salud del individuo mismo, pero más aún de generaciones posteriores, este fenómeno es descrito por primera vez por David Barker⁴³.

David Barker conocido como el padre de la “programación”, en el año de 1990 formula la hipótesis donde menciona que las enfermedades desarrolladas en el adulto tienen origen en la vida fetal.

La “programación” se define como un evento adverso en un período crítico y sensible de la vida temprana que producirá efectos permanentes sobre la estructura, fisiología y metabolismo del sujeto y que puede extenderse hasta las siguientes generaciones.

La "hipótesis de Barker" también llamada "el origen fetal de la enfermedad de los adultos", está basada en la teoría de la “plasticidad del desarrollo” y del cómo la influencia de eventos intrauterinos específicos tiene la capacidad de producir cambios relevantes en el individuo. Existen períodos específicos del desarrollo donde el organismo es más vulnerable a estos cambios debido a su plasticidad; esta característica le confiere un mejor ajuste al medio ambiente adverso, asegurando su supervivencia. Dicha característica de plasticidad, conforme avanza la edad disminuye hasta hacerse nula y los cambios podrían convertirse en patologías. Este fenómeno es conocido en la actualidad como “programación”, donde los estímulos adversos aplicables durante el desarrollo temprano pueden tener afectaciones que persistirán a lo largo de la vida. Es importante mencionar que la “programación” no solo se refiere a los cambios en el medio

ambiente intrauterino, si no que se extiende hasta la infancia, donde órganos y sistemas continúan adaptándose y por tanto son aún susceptibles a estos estímulos adversos.⁴⁴

Los factores ambientales también pueden alterar las trayectorias adecuadas del desarrollo, provocando perturbaciones endócrinas, las cuales han recibido considerable atención ya que están relacionados con trastornos del sistema endocrino. Estos perturbadores endocrinos pueden ser naturales o sintéticos y son capaces de interferir en la biosíntesis, almacenamiento, liberación, transporte y unión a receptores endógenos, interfiriendo así con funciones propias de ligandos específicos como las hormonas.⁴⁵

Los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la programación no están descritos con exactitud pero se conocen estas 3 propuestas:

- a) Los mecanismos genómicos son aquellos donde las sustancias alteradas por el medio ambiente, se acoplan a receptores nucleares formando dímeros y esto produce una transcripción anómala o bien estos mismos actúan sobre factores de transcripción propios provocando una codificación errónea.
- b) Los mecanismos no genómicos son aquellos donde las sustancias endócrinas modificadas se unen a receptores membranales y generan vías de señalización que activarán o desactivarán la maquinaria epigenética activando porciones promotoras e iniciando transcripción o bien generando lo contrario, la represión génica.
- c) Los mecanismos provocados por el ambiente celular alterado. En este, las sustancias endocrinas alteradas pueden ingresar a la célula directamente y generar especies reactivas de oxígeno que modificarán el ambiente celular y generan metabolitos tóxicos que repercutirán directamente sobre el genoma, activando o inhibiendo transcripción o bien dañando directamente el ADN. Unos de estos factores pueden ser, el estrés oxidativo.⁴⁵

Fisiología del Estrés

Existen tres sistemas relacionados directamente a la fisiopatología del estrés. El sistema nervioso central (SNC), el sistema endócrino y el sistema inmune. Comprender estos tres sistemas y su relación, así como sus modificaciones durante situaciones estresantes nos permiten comprender la fisiología del estrés.^{46, 47}

La respuesta neuroendócrina aguda al estímulo del estrés psicológico es caracterizada por una acción tripartita de 3 ejes incluyendo el sistema nervioso autónomo simpático, la inervación neural directa de la corteza adrenal y la cascada de mensajeros hormonales (eje hipotálamo hipófisis adrenal. Ambos el sistema autónomo simpático y el eje hipotálamo hipófisis adrenal (HPA) utilizan inervaciones neuronales en la médula y la corteza adrenal para liberar catecolaminas activando la corteza adrenal para las subsecuentes señales hormonales. Este proceso es iniciado por neuronas neurosecretoras en el núcleo paraventricular en el hipotálamo, el cual libera hormona liberadora de corticotropina y arginina vasopresina en la circulación portal de la hipófisis.⁴⁸

Estos dos factores actúan sinérgicamente sobre en células corticotropas para estimular la liberación del fragmento péptido proopiomelanocortina y hormona adrenocorticotrópica en la circulación.

La hormona adrenocorticotrópica activa el receptor 2 melanocorticoide en la zona fasciculata de la corteza adrenal para iniciar la síntesis de novo y la liberación de los glucocorticoides, primordialmente cortisol en humanos y corticosterona en roedores. Juntas estas hormonas forman una cascada de señalización que constituye el eje hipotalámico hipófisis adrenal.

El efecto psicológico de la corticosterona en el cerebro es canónicamente mediado por un receptor glucocorticoide de baja afinidad (con la excepción del núcleo supraquiasmático del hipotálamo), y por un receptor mineralocorticoide con una región del alta especificidad. Típicamente estos receptores residen en el citoplasma heterocomplejo con proteínas de choque de calor e inmunofilinas, las cuales mantienen la afinidad de la

unión del dominio de la hormona. Las hormonas esteroideas son permeables a la membrana celular y pueden unirse a sus receptores, causando la disociación de proteínas chaperonas y la translocación en el núcleo donde el complejo del receptor activado forma homo y hetero dímeros que tras una serie de pasos resultaran en la activación o represión de genes objetivo dependiendo del contexto celular.⁴⁹

En la circulación los glucocorticoides adrenales alcanzan un pico en concentración plasmática aproximadamente después de 30 minutos de la activación del eje HPA. A nivel celular estas hormonas actúan en conjunto con catecolaminas para facilitar la disponibilidad de glucosa e incrementar la velocidad metabólica la cual incrementa la producción de radicales libres.⁵⁰

El estrés oxidativo ha sido implicado en respuesta al estrés psicológico⁵¹ y en la patogénesis de enfermedades neurológicas y psiquiátricas.⁵²

La producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) por la mitocondria es comúnmente la principal causa del estrés oxidativo, pero otras fuentes de ERO están emergiendo en particular las enzimas NADPH oxidasa (NOX), una familia de proteínas membranales con la única función de generar ERO. La presencia de transcriptores de NOX1, NOX2, NOX3 y NOX4 han sido identificados en muestras de tejido cerebral, en particular en porciones específicas de dichos tejidos. Por ejemplo NOX1, NOX2 y NOX4 están presentes en las neuronas, astrocitos y microglía, aunque la localización de NOX3 no ha sido identificada. Ya se ha hecho mención de la capacidad de las ERO en la modificación de funciones celulares producto de la oxidación de diferentes proteínas en el organismo pero en el sistema nervioso central las enzimas NOX (productoras de ERO) juegan un papel importantísimo en diferentes funciones fisiológicas (como la diferenciación neuronal y la señalización), pero también contribuyen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas y desordenes psiquiátricos.²⁴

Se ha informado de la relación existente entre el eje HPA y el estrés oxidativo.⁵³ Es posible que el impacto de los corticosteroides en la producción de ERO por la acción de las enzimas NOX sea dependiente del tipo celular.

Hay evidencia reportada de la relación entre el daño cerebral por estrés oxidativo y las enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, esclerosis amiotrófica lateral, desordenes cerebrovasculares, enfermedades desmielificantes y desordenes psiquiátricos. Esta situación ha sido estudiada tanto en humanos como en otros animales.⁵⁴

En el sistema nervioso central las ERO tienen un papel muy importante ya que si se acumulan pueden disparar cascadas neuromusculares llevando a un incremento en la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, alteración de la morfología, la neuroinflamación y la muerte neuronal.⁵⁵

Si bien los mecanismos exactos que unen al estrés oxidativo con el eje HPA son relativamente desconocidos se piensa que las ERO pueden afectar el eje HPA por diferentes mecanismos, como son:

- Alteración de la translocación normal de los receptores de glucocorticoides del citoplasma hacia el núcleo
- Incremento en la toxicidad del glutamato inducida por estrés
- Modulación de cinasas y proteínas sensitivas redox ricas en cisteína
- Alteraciones en la síntesis de ARN.
- Compuestos orgánicos e inorgánicos como metales pesados (zinc y cadmio), disolventes orgánicos y sustancias citotóxicas ambientales como las que se encuentran en el humo de cigarro.
- Desafíos físicos como radiación ionizante (UVA y UVB), fuerzas físicas cambios en la temperatura, presión osmótica.
- Estímulos inflamatorios como endotoxinas bacterianas como lipopolisacáridos. Así en la microglía y en los astrocitos este factor es conocido por estimular la producción de ERO dependientes de NOX y la producción de óxido nítrico por la expresión de las óxido nítrico sintasas.²⁴

El cerebro es un órgano particularmente susceptible al estrés oxidativo. Este fenómeno se debe a que el cerebro es el mayor metabolizador de oxígeno (20% del consumo corporal) pero tiene mecanismos antioxidantes débiles. El cerebro tiene una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados

peroxidables, junto con una gran cantidad de hierro que actúa como un prooxidante y a veces induce la muerte celular por autofagia en los accidentes cerebrovasculares hemorrágicos. La transmisión sináptica que involucra a la dopamina y a la oxidación del glutamato puede ocurrir en el cerebro. Además la lipoperoxidación lleva a la producción de compuestos tóxicos como aldehídos o dienos (hidroxinonenal) que pueden llevar a la apoptosis neuronal.

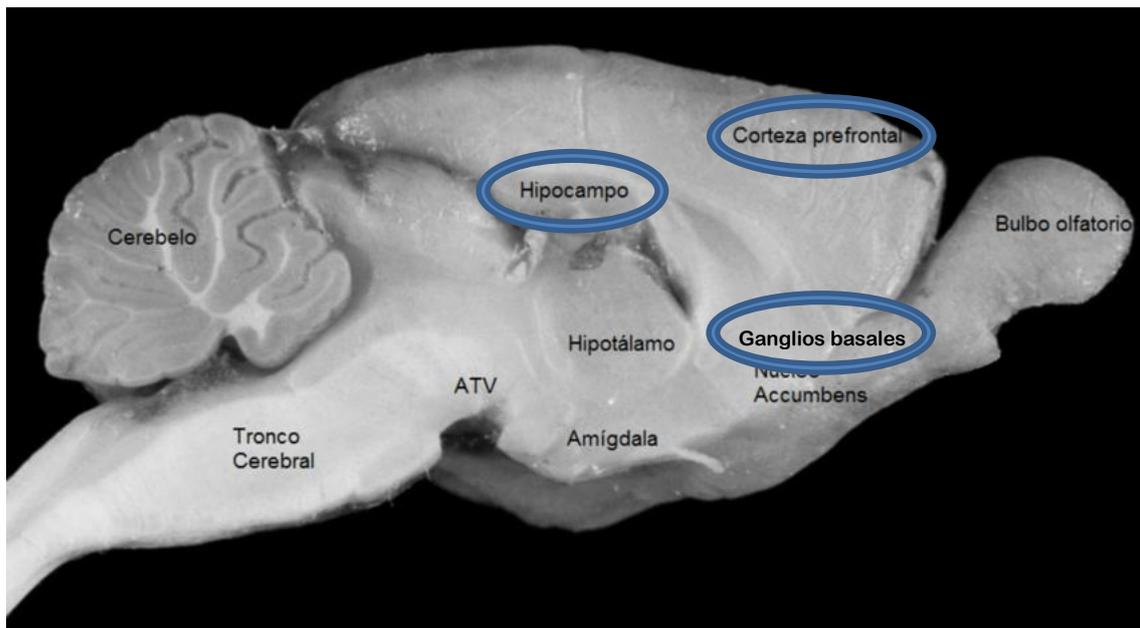


Figura 13.1 Corte sagital del encéfalo de una rata, se muestran encerradas las áreas estudiadas en el presente trabajo: Hipocampo, ganglios basales y corteza prefrontal.

Planteamiento del problema

Cada día aumentan los factores estresantes en la población y pueden deberse a diversos motivos como son económicos, sociales, laborales, familiares, etc., y con ello condiciones como el estrés oxidativo pueden aparecer como consecuencia. Un grupo particular de la población que sufre de estos factores estresantes y que no ha sido lo suficientemente estudiado es la población de mujeres embarazadas y cómo estos factores estresantes repercuten bioquímicamente en cuestiones de estrés oxidativo a la progenie. Para estudiar dicho fenómeno se recreó en un modelo animal de estrés psicológico tanto como para las madres como para las crías y se midieron diferentes biomarcadores de estrés oxidativo únicamente en las crías de 121 días de edad con la finalidad de contribuir en el entendimiento de las modificaciones bioquímicas que ocurren en individuos que han sufrido de este fenómeno psicosocial y poder, a futuro, trabajar sobre tratamientos tanto farmacológicos como no farmacológicos para prevenir o mejorar la farmacoterapia en dichos casos.

Hipótesis

La exposición al estrés psicológico en ratas gestantes aunado a condiciones de estrés postnatal en las crías, producirá una serie de modificaciones bioquímicas tanto en las madres como en las crías que darán paso a la condición conocida como estrés oxidativo, la cual podrá ser evaluada en plasma y cerebro.

Objetivos

Objetivo general:

Con el propósito de determinar si el estrés psicológico es capaz de producir estrés oxidante en la progenie, se recreó en un modelo animal un entorno de estrés psicológico, tanto en las ratas gestantes como en sus crías, mediante restricción de movimiento y separación materna respectivamente, para después medir distintos biomarcadores de estrés oxidativo tanto a nivel sistémico como cerebral y así poder determinar si tales condiciones están relacionadas.

Objetivos particulares:

1. Medir la producción de óxido nítrico, mediante la estimación de sus metabolitos finales estables: nitritos y nitratos, tanto en plasma como en el cerebro de ratas adultas jóvenes estresadas perinatalmente.

2. Determinar la actividad de la enzima arginasa, en plasma y en el cerebro de ratas adultas jóvenes estresadas perinatalmente.

3. Medir los siguientes parámetros indicativos de estrés oxidativo en plasma y en cerebro de ratas adultas jóvenes estresadas perinatalmente: concentración de sulfhidrilos, daño a proteínas por hidroxilación, cuantificación de proteínas y capacidad antioxidante total.

Material y métodos

Diseño

Según la clasificación de Méndez el diseño es experimental, prolectivo, longitudinal, comparativo.

Universo

En el diseño experimental se emplearon ratas de la cepa Wistar jóvenes adultas (10-14 semanas).

Variables

- Variable independiente

Aplicación del protocolo para la inducción de estrés psicológico

- Variable dependiente

Aumento en los valores de los Biomarcadores de estrés oxidativo

Descripción de la metodología

Para el presente trabajo de tesis en investigación, se obtuvo el plasma y tejido cerebral (hipocampo, corteza prefrontal y ganglios basales) de animales sometidos a protocolos de estrés perinatal. A continuación se describe el diseño experimental que se utilizó.

Durante una semana después de la llegada al laboratorio las ratas fueron alojadas en grupos (5 por jaula). Los animales se mantuvieron con un ciclo invertido de luz/oscuridad de 12/12 horas, en un cuarto a temperatura ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad (50%) constantes.

Se utilizó agua potable y alimento ad libitum. El manejo general de los animales se realizó de acuerdo a los principios generales para el cuidado de animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Apareamiento

Se colocó cada hembra con un macho durante un ciclo estral completo (cuatro días) para que tuviera lugar el apareamiento entre ambos. Durante estos días, se llevó a cabo frotis vaginal de las ratas hembra para determinar el primer día de gestación (el día posterior al tapón vaginal). Las ratas gestantes fueron asignadas aleatoriamente a los diferentes grupos y el número de crías por madre se mantuvo constante.

En el modelo experimental se utilizaron 4 ratas hembras por grupo ($n=4$), por lo cual fueron utilizadas un total de 16 ratas hembra. Se plantearon 4 grupos de estudio que a continuación se describen.

- Grupo 1: Gestantes sanas, no sometidas a estrés prenatal (M-), cuya progenie no fue sometida a ningún tipo de estrés (P-).
- Grupo 2: Gestantes sometidas a estrés por restricción al movimiento (M+), cuya progenie no fue sometida a ningún tipo de estrés (P-).
- Grupo 3: Gestantes sanas (M-), cuya progenie fue sometida a estrés neonatal por separación materna (P+)

- Grupo 4: Gestantes sometidas a estrés prenatal por restricción al movimiento (M+), cuya progenie fue sometida a estrés neonatal por separación materna (P+).

De cada gestante fueron seleccionadas 3 ratas macho, posterior al destete. Lo anterior generara cuatro subgrupos de n=12.

- Subgrupo F1: M-/P-
- Subgrupo F2: M+/P-
- Subgrupo F3: M-/P+
- Subgrupo F4: M+/P+

Inducción de estrés prenatal por restricción de movimiento (ECR)

Para generar la condición de estrés prenatal se empleó un modelo de restricción de movimiento. Las ratas gestantes de los grupos G2 y G4 fueron colocadas en un restrictor de acrílico muy ventilado por periodos de 45 minutos tres veces a día, durante los últimos 11 días de gestación. El restrictor tiene 4 compartimentos de 7.5 cm de ancho, 8 cm de alto y 18 cm de largo.⁵⁶



Figura 14. Inducción del estrés por restricción del movimiento⁵⁷

Inducción del estrés postnatal por separación materna (ESM)

En el momento del parto las crías se mantuvieron con sus respectivas madres. Posteriormente, la progenie de los grupos G2 y G4 fueron separadas de sus madres durante 180 min diariamente desde el día 2 después del nacimiento, hasta el día 14 los animales fueron alojados en un

cuarto a $33 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, del día dos después del parto al día 5 postparto. La separación materna se realizó en horario de 9:00 a 12:00 h. La progenie de los grupos G1 y G3, se mantuvo bajo condiciones de temperatura ambiente de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ y las crías no fueron separadas de la madre. A los 21 días de edad fueron retiradas las ratas madre. De cada camada al ser destetadas, las crías fueron sexadas y seleccionadas 3 ratas macho por camada. La progenie se mantuvo hasta los 121 días de edad con el objetivo de realizar estudios en cerebro y plasma a la edad adulta.

Preparación de muestras de plasma

Se obtuvieron muestras sanguíneas de la vena caudal y fueron colocadas en tubos vacutainer conteniendo anticoagulante (heparina). Para separar el plasma las muestras de sangre fueron centrifugadas a 2 500 rpm en centrifuga clínica thermoscientific durante 10 minutos a 4°C , y conservadas a -70°C hasta la utilización del plasma.

Preparación de muestras de cerebro

Las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación. Se extrajeron los hipocampos, ganglios basales y cortezas prefrontales de todos los grupos experimentales. Se colocaron en tubos y se guardaron en ultracongelación hasta su utilización. Para realizar el homogeneizado se colocó la muestra sobre una caja Petri con hielo para remover rastros de eritrocitos de forma mecánica. Posteriormente se pesó cada estructura para preparar un homogeneizado al 10% con solución (TRIS 50 mM conteniendo tritón 100x al 0.2% fluoruro de fenilmetilsulfonilo (inhibidor de proteasas), EDTA 0.1mM 1mM pH 7.4). Con ayuda de un homogeneizador se procesa la muestra hasta obtener una mezcla homogénea, se enfría sobre hielo 5 minutos y se procede a centrifugar 5 minutos a 10000 rpm a 4°C . Se recolecta el sobrenadante.

Técnicas bioquímicas para la medición de biomarcadores de estrés oxidativo y metabolismo el óxido nítrico.

Cuantificación de nitritos

En plasma

Se colocaron 100µL del plasma en unidades de filtración Amicon Ultra de suero y se centrifugó a 12000 rpm /30 minutos a 20°C. De dicho filtrado se toman 50µL se adicionaron 100µL de agua, 150µL de cloruro de vanadio (III) al 0.08% y 150µL de una mezcla 1:1 de sulfanilamida al 2% y N-(1-Naftil)etilendiamina al 0.1%. Se agita e incuba a 37°C por 1 hora y se lee contra un blanco a 545nm. Se realizó una curva estándar usando nitrato de sodio para los cálculos.¹⁵

En tejido cerebral

Se tomaron 50 µL del homogeneizado cerebral previamente realizado y sin filtrar se repitió el mismo procedimiento que en el plasma.

Determinación de la actividad de la enzima arginasa

En plasma

Se colocaron en microtubos 10µL de plasma junto con 40 µL de MnCl₂ 6 mM, se incubaron a 55°C 10 minutos para activar la enzima. Posteriormente se colocaron 50µL de Arginina 0.5M pH 9.6 y se incubaron a 37°C durante una hora. Después se adicionaron 100 µL de ácido tricloroacético al 20%, se agitó y se dejó reposar sobre hielo durante 5 minutos. Se centrifugó a 10000 rpm/5 min y se tomaron 100µL del sobrenadante, se colocó en un tubo nuevo y se adicionaron 400 µL de mezcla ácida (ácido sulfúrico, ácido fosfórico y agua 1:3:7) y 25 microlitros de α-isonitrosopropiophenone (ISPF) preparado en dimetilsulfoxido. Se agitó y se incubó a 100°C en baño de agua por 45 min. Se dejó enfriar sobre hielo, se centrifugó bajo las mismas condiciones mencionadas anteriormente y se leyó el sobrenadante a 540nm. Se realizó una curva estándar de urea para determinar la actividad de la enzima.¹⁴

En cerebro

Se realizó la misma operación que en plasma pero se ocuparon 30 μL de homogeneizado de cerebro al 10% + 40 μL de MnCl_2 6 mM.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Debido a la alta sensibilidad de esta técnica se realizó una dilución 1:20 del plasma con agua. Se tomaron 10 μL de la dilución y se colocaron en un tubo de ensayo donde se le adicionó 1 mL de la solución C (25 ml de carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1N + 500 μL de sulfato de cobre en tartrato de sodio en potasio) y 1 mL de reactivo de Folin en agua 1:1. Se incubó a temperatura ambiente por 45 minutos y se leyó en el espectro a 545nm. Se utilizó una curva estándar usando albúmina bovina para los cálculos.¹⁹

En cerebro

Se realizó el mismo procedimiento solo que en lugar de utilizar plasma diluido se tomaron 10 μL de homogeneizado y se trató la muestra de la misma forma que el plasma.

Capacidad antioxidante por el método de CUPRAC

Se colocaron 10 μL de plasma en un microtubo, se adicionaron 490 μL de nitrato cúprico 10 mM y 500 μL de Neocuproína, se incubó por 45 minutos a 50°C y se leyó en el espectro a 450nm. Se realizó una curva estándar con trolox.⁸

Cuantificación de daño a proteínas por hidroxilación

Se preparó una disolución 0.24 mM de nitroazul de tetrazolio en glicina/ NaOH 2M pH10. Se colocaron 10 μL de plasma en un tubo y se le adicionaron 990 μL de la disolución preparada. Se incubó por 40 minutos a 37°C y se leyó contra un blanco a 530nm.^{9, 10,11}

Cuantificación de sulfhidrilos totales

En plasma

A una muestra de 50 μL de plasma se le adicionaron 200 μL de tris(hidroximetil)aminometano (TRIS) pH 8.2, posteriormente se adicionaron 50 μL del reactivo de Ellman (DTNB 5,5-ditio-bis-(2-ácido nitrobenzónico)) 0.4mM. Se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y protegido de la luz. Al término de la incubación se colocaron 500 μL de acetonitrilo, se agitó y colocó sobre hielo por 10 minutos, posteriormente se centrifuga a 10000 rpm por 3 minutos a 4°C, se recolectó el sobrenadante y se leyó a 412 nm. Se utilizó una curva estándar de cisteína para los cálculos.^{6,7}

En cerebro

Se realizó la misma operación que en el caso de plasma solo cambian las proporciones de los reactivos 20 μL de homogeneizado de cerebro al 10% +230 μL de TRIS + 50 μL de DTNB + 500 μL de acetonitrilo. De igual forma se preparó un blanco exceptuando el DTNB.

Actividad de la enzima Nitrosoglutación reductasa en cerebro

En celdas de cuarzo se colocaron 20 μL de homogeneizado cerebral al 10% + 10 μL de NADH 10 mM (preparado en TRIS HCl 50 mM pH 7.5 – EDTA 50 mM pH 7.5) + 460 μL de amortiguador TRIS mM –EDTA 0.5mM pH 7.5. Se ajusta a cero con una celdilla y a la otra se le adicionan 10 μL de S-nitroso glutatión 10 mM preparado en TRIS HCl 50 mM EDTA pH 7.5 preparado el mismo día de la prueba. Se leyó cada 15 segundos por 10 minutos a 340 nm. Leído en spectrophotometer Beckman coulter DU 800.^{17, 18}

Cuantificación de Malondialdehido en cerebro

Se colocaron 100 μL de homogeneizado cerebral al 10% + 100 μL de H₂O + 325 μL de MPI (methyl-2-phenylindole) 15 mM en acetonitrilo metanol 3:1 (preparado el día de su uso) + 75 μL de HCl 36%. Se incubó a 45 °C por 40 minutos. Se leyó contra un blanco a 586nm.^{12, 13}

Resultados

Evaluación del estrés oxidativo

Con la finalidad de evaluar el estrés oxidativo en los animales de los diferentes grupos de estudio, se utilizaron los biomarcadores: Sulfhidrilos totales, Daño a proteínas, Capacidad antioxidante y Cuantificación de malondialdehído de acuerdo a la metodología descrita.

Daño a proteínas en plasma

Para la evaluación del daño a proteínas por hidroxilación se utilizó la técnica de la reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) previamente descrita, encontrándose una disminución en dicho biomarcador en el grupo de estrés postnatal ($0.1343840 \text{ nmol min mg d prot } \pm 0.02174240$). Comparado con el grupo control ($0.1935284 \text{ nmol mg de prot } \pm 0.01609106$) $p < 0.05$ (Figura 15).

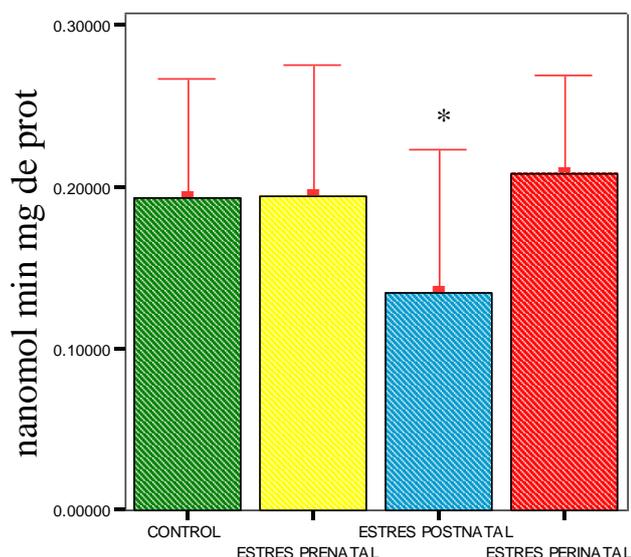


Figura 15. Daño a proteínas en plasma

Cuantificación del daño a proteínas en plasma por reducción del NBT. La gráfica muestra los 4 grupos de estudio: en verde el grupo control, en

amarillo el grupo de estrés prenatal, en azul el grupo de estrés postnatal y finalmente en rojo el grupo de estrés perinatal. Se muestra con * aquellos grupos que tuvieron una $p < 0.05$ por lo que son considerados como significativos. Se utilizó la prueba estadística de hipótesis de Kruskal Wallis.

Capacidad antioxidante en plasma

Utilizando la técnica de la reducción del complejo neocuproína-cobre se determinó la capacidad antioxidante del plasma. Esta prueba mostró que hay una menor capacidad antioxidante en el grupo de estrés perinatal ($0.0436027 \mu\text{mol}$ equivalentes de trolox/mg proteína ± 0.00244129) comparada con el grupo control ($0.0498856 \mu\text{mol}$ equivalentes de trolox/proteína ± 0.0025109) en plasma $p < 0.05$ (Figura 16).

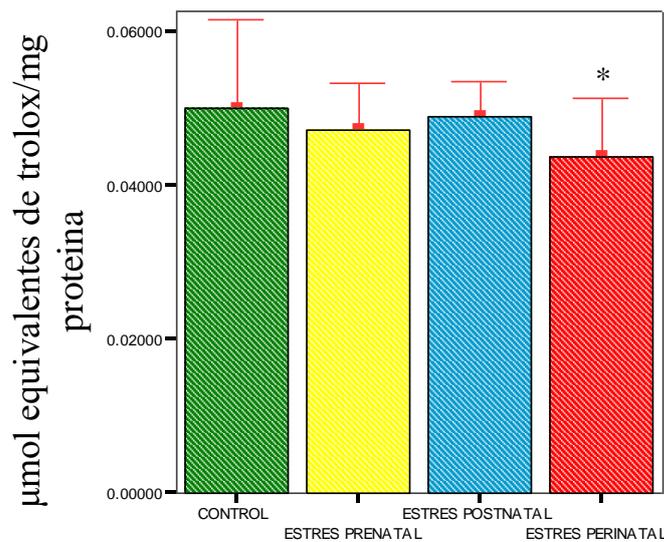


Figura 16. Capacidad antioxidante en plasma

Cuantificación de la capacidad antioxidante del plasma medido como μmol equivalentes de trolox/mg proteína. La gráfica muestra los 4 grupos de estudio: en verde el grupo control, en amarillo el grupo de estrés prenatal, en azul el grupo de estrés postnatal y finalmente en rojo el grupo de estrés perinatal. Se muestra con * aquellos grupos que tuvieron una $p < 0.05$ por lo que son considerados como significativos. Se utilizó la prueba estadística de hipótesis de Kruskal Wallis.

Malondialdehido

Con la finalidad de hacer una cuantificación del malondialdehido en el cerebro se utilizó la técnica de la formación de un aducto con 1- metil-2 fenilindol que se midió espectrofotométricamente. Ahora bien en el hipocampo en particular un aumento de la cantidad de esta molécula en el grupo de estrés perinatal (11.4284543 nmol mg de prot +/- 7.936972) comparado con el grupo control (4.102963 nmol mg de prot +/- 0.4351938) $p < 0.05$ (Figura 17). De forma similar ocurre en la región de la corteza prefrontal donde de forma análoga aumenta la cantidad de malondialdehido en el grupo de estrés perinatal (5.0763711 nmol mg de prot +/- 5.076311) comparado con el grupo control (5.4384488 nmol mg de prot +/- 2.777965) $p < 0.05$ (Figura 18). Una situación contraria sucede en la región de los ganglios basales donde justamente en el mismo grupo de estrés perinatal (1.3866667 nmol mg de prot +/- 0.4681728) disminuye la cantidad de malondialdehido casi a un tercio comparado con el grupo control (3.9653333 nmol mg de prot +/- 0.49763887) $p < 0.05$ (Figura 19).

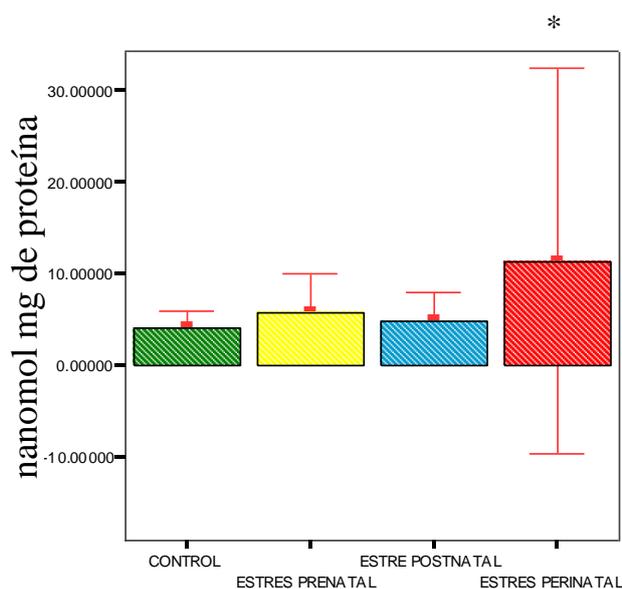


Figura 17. Malondialdehido en hipocampo

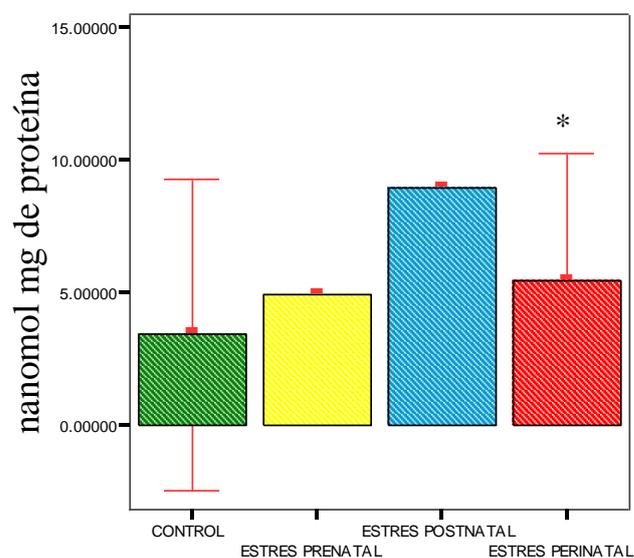


Figura 18. Malondialdehido en corteza prefrontal

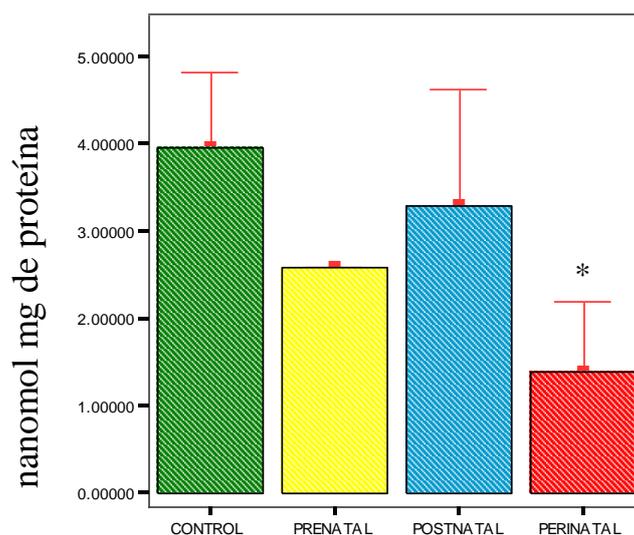


Figura 19. Malondialdehído en ganglios basales

Cuantificación del malondialdehído por la formación de un aducto con 1-metil-2 expresado en nanomol mg de proteína. Las gráficas muestran los 4 grupos de estudio: en verde el grupo control, en amarillo el grupo de estrés prenatal, en azul el grupo de estrés postnatal y finalmente en rojo el grupo de estrés perinatal. Se muestra con * aquellos grupos que tuvieron una $p < 0.05$ por lo que son considerados como significativos. Se utilizó la prueba estadística de hipótesis de Kruskal Wallis.

Sulfhidrilos totales

Como se mencionó en la metodología la cuantificación de sulfhidrilos totales se llevó a cabo mediante una reacción colorimétrica con el reactivo de Ellman. Los resultados mostraron que en la región hipocámpal no hay diferencia en la cantidad de nanomoles por mg de proteína entre los grupos (Figura 20). Mientras que en los ganglios basales se observa diferencia estadísticamente significativa en los grupos de estrés post natal (0.0291696 nmol/mg prot +/- 0.00151326) y perinatal (0.0296152 nmol/mg de prot +/- 0.00105416) comparados contra el grupo control (0.6282488nmol/mg de prot +/- 0.02144845) $p < 0.05$ (Figura 21). En el grupo de estrés prenatal en esa misma región tiene diferencia estadísticamente significativa aunque no se tomará en cuenta ya que es solo un dato y no un promedio, se tuvo la misma consideración para los siguientes biomarcadores. Es de resaltar que

la cantidad de sulfhidrilos promedio en hipocampo es aproximadamente 100 veces mayor en hipocampo que en corteza basal.

Por otro lado, se observó una disminución importante de sulfhidrilos plasmáticos en los grupos de estrés prenatal (1.8993932 nmol/mg de prot +/- 0.28998475) y perinatal (2.3414666 nmol/mg de prot +/-0.41630069) comparados contra el grupo control (2.6724823 nmol/mg de prot +/- 0.19131605) $p < 0.05$ (Figura 22).

En corteza prefrontal ocurre la misma situación, pareciera que hay una considerable disminución en sulfhidrilos tanto en el grupo de estrés prenatal y postnatal pero también solo es un dato y no un promedio por lo que no se considerará (Figura 23).

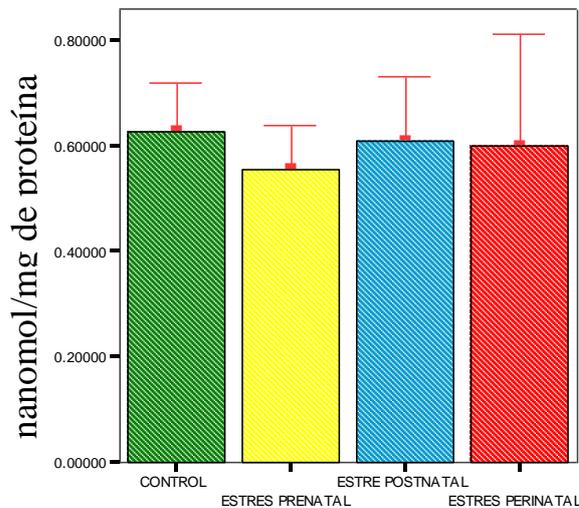


Figura 20. Sulfhidrilos en hipocampo

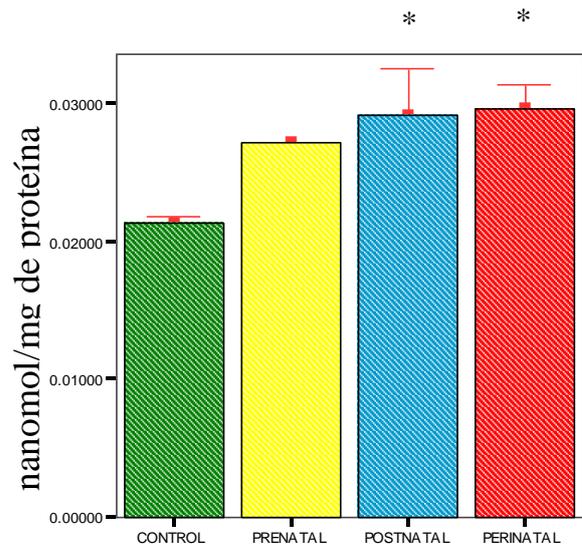


Figura 21. Sulfhidrilos en ganglios basales

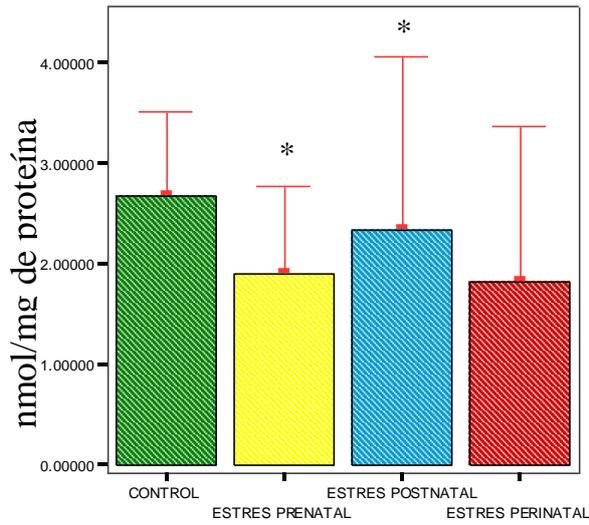


Figura 22. Sulfhidrilos en plasma

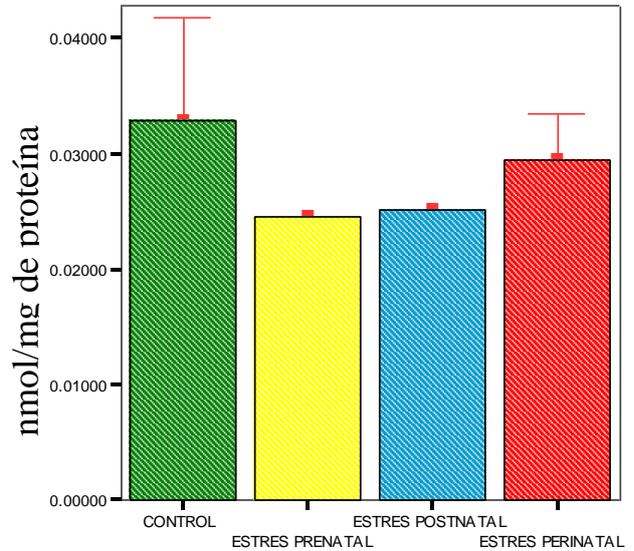


Figura 23. Sulfhidrilos en corteza prefrontal

Cuantificación de sulfhidrilos por medio de la reacción de Ellman. Las gráficas muestran los 4 grupos de estudio: en verde el grupo control, en amarillo el grupo de estrés prenatal, en azul el grupo de estrés postnatal y finalmente en rojo el grupo de estrés perinatal. Se muestra con * aquellos grupos que tuvieron una $p < 0.05$ por lo que son considerados como significativos. Se utilizó la prueba estadística de hipótesis de Kruskal Wallis.

Evaluación del metabolismo del óxido nítrico

Para evaluar el metabolismo del óxido nítrico en los animales de los diferentes grupos de estudio, se utilizaron los biomarcadores: Nitratos y nitritos, Actividad de la enzima Arginasa y Actividad de la enzima Glutación Reductasa (GSNOR) de acuerdo a la metodología descrita.

Nitratos y Nitritos

Para realizar la cuantificación de este biomarcador se ocupó la técnica de la formación de un compuesto de sal de diazonio, el cuál puede ser detectado espectrofotométricamente. Se encontró que en la región hipocampal hay una disminución en la producción de nitratos y nitritos en el grupo de estrés prenatal (0.0345776 mol mg de prot +/- 0.00536156) comparado con el grupo control (0.0585153 nmol/mg de prot +/- 0.01060955) $p < 0.05$ (Figura 24).

En la región de los ganglios basales se encontró un aumento estadísticamente significativo en el grupo de estrés post natal (0.0775951 nmol mg de prot +/-0.00632359) comparado con el grupo control (0.0444285 nmol mg de prot +/- 0.00490438) $p < 0.05$ (Figura 25). Ahora bien en la corteza prefrontal (Figura 26) se encontró un aumento en la cantidad de nitritos en el grupo de estrés perinatal (0.0833895 nmol de prot +/- 0.01755595) comparado con el grupo control (0.0362119 nmol mg de prot +/- 0.0278547) $p < 0.05$. Por último a nivel plasmático se encontró una marcada disminución de la cantidad de nitritos en los tres grupos de estudio: estrés prenatal (0.005073 nano mol mg de prot +/- 0.03581507), postnatal (0.1530655 n mol mg de prot +/- 0.04245764) y perinatal (0.02567132 n mol mg de prot +/- 0.0267935) comparados contra el grupo control (0.502399 n mol mg de prot +/- 0.0841577) $p < 0.05$ (Figura 27).

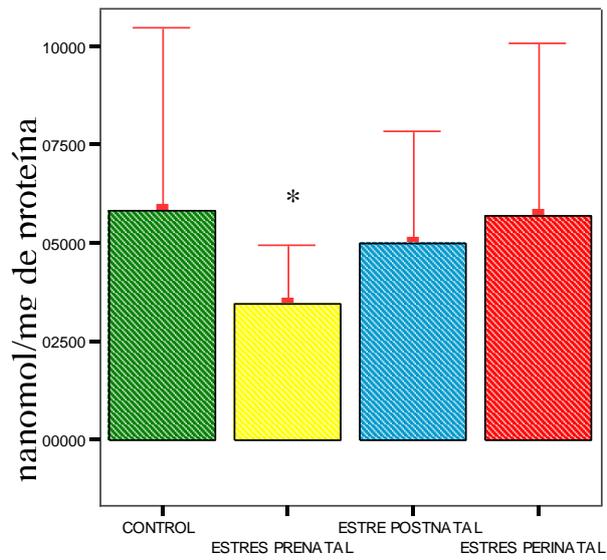


Figura 24. Nitratos y nitritos en hipocampo

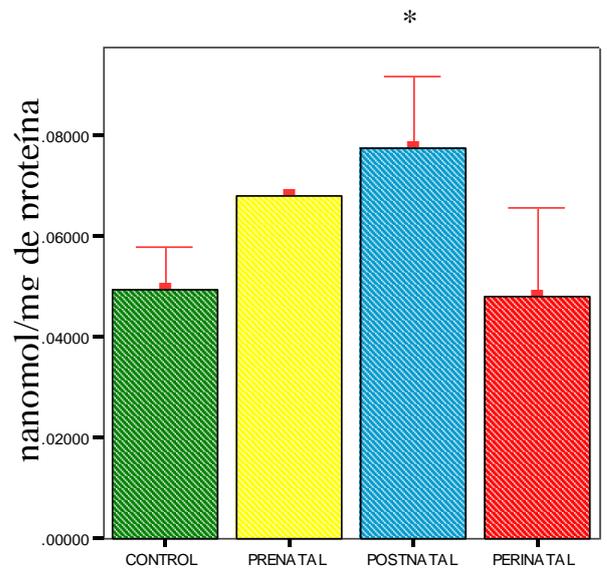


Figura 25. Nitratos y nitritos en corteza basal

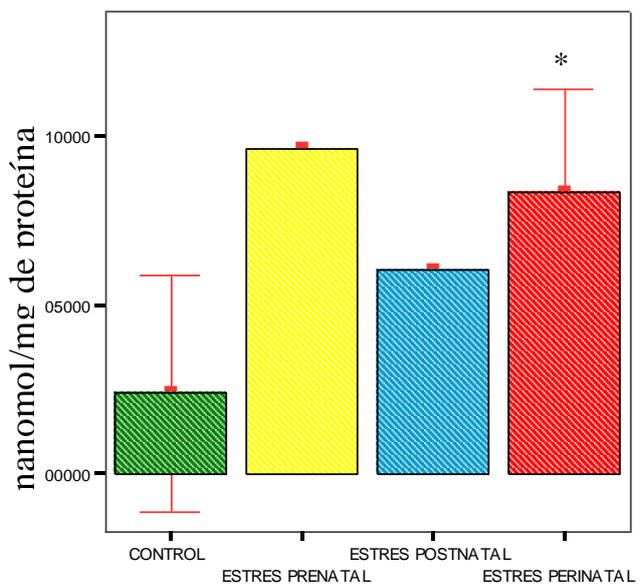


Figura 26. Nitratos y nitritos en corteza prefrontal

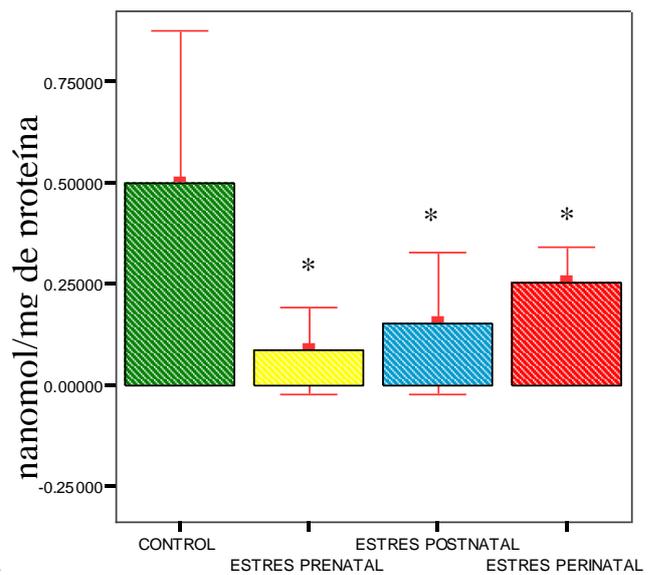


Figura 27. Nitratos y nitritos en plasma

Cuantificación de los nitratos y nitritos como indicador de la formación endógena de óxido nítrico. Las gráficas muestran los 4 grupos de estudio: en verde el grupo control, en amarillo el grupo de estrés prenatal, en azul el grupo de estrés postnatal y finalmente en rojo el grupo de estrés perinatal.

Se muestra con * aquellos grupos que tuvieron una $p < 0.05$ por lo que son considerados como significativos. Se utilizó la prueba estadística de hipótesis de Kruskal Wallis.

Actividad de la enzima Arginasa

Para la determinación de la actividad de dicha enzima se utilizó una técnica que permite la formación de un aducto colorido con la reacción de Griess que puede leerse espectrofotométricamente. Encontramos que en la región hipocampal no hubo cambios en la actividad de la enzima Arginasa entre los grupos (Figura 28). Mientras que en los ganglios basales se observa un aumento en la actividad de la enzima en el grupo de estrés perinatal ($0.5456780 \text{ nmol min mg prot } \pm .02870280$) comparado contra el grupo control ($0.4497206 \text{ nmol min mg prot } \pm 0.08014462$) $p < 0.05$ (Figura 29).

En la región cerebral de la corteza prefrontal únicamente se presenta un aumento en la actividad de la enzima en el grupo de estrés prenatal que al ser un solo dato no se tomara en consideración (Figura 30). En cuanto a la actividad de la enzima en el plasma se nota un marcado aumento de la actividad de la enzima en el grupo de estrés perinatal ($2.3799458 \text{ nmol min mg prot } \pm 0.19729417$) comparado contra el grupo control ($1.7714218 \text{ nmol min mg de prot } \pm 0.10413754$) $p < 0.05$ (Figura 31).

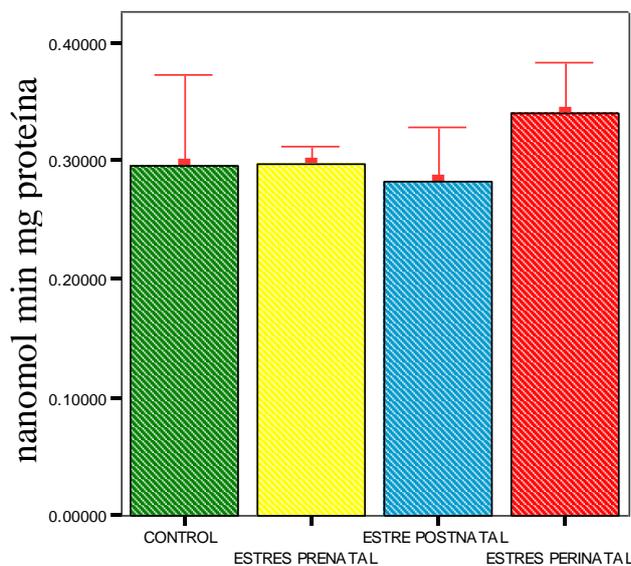


Figura 29. Actividad de la enzima Arginasa en corteza basal

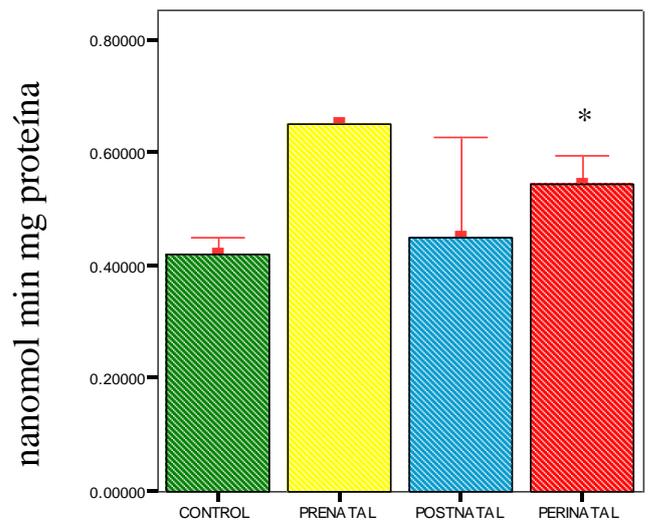


Figura 28. Actividad de la enzima Arginasa en hipocampo

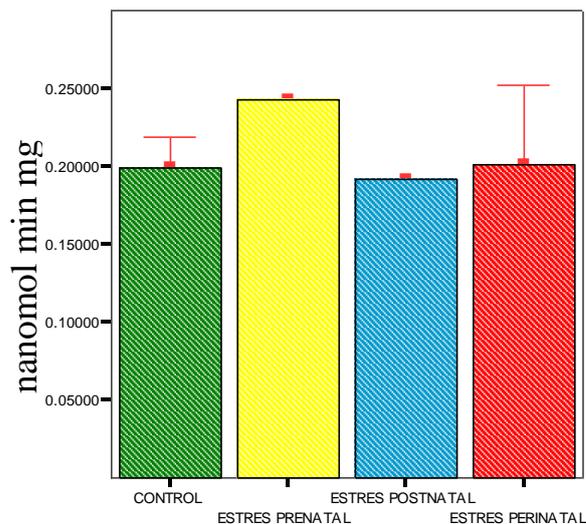


Figura 30. Actividad de la enzima Arginasa en corteza prefrontal

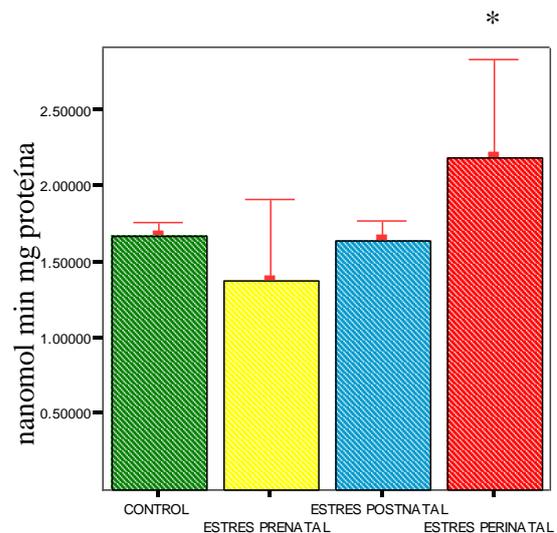


Figura 31. Actividad de la enzima Arginasa en plasma

Cuantificación de la actividad de la enzima Arginasa. Las gráficas muestran los 4 grupos de estudio: en verde el grupo control, en amarillo el grupo de estrés prenatal, en azul el grupo de estrés postnatal y finalmente en rojo el grupo de estrés perinatal. Se muestra con * aquellos grupos que tuvieron una $p < 0.05$ por lo que son considerados como significativos. Se utilizó la prueba estadística de hipótesis de Kruskal Wallis.

Actividad de la enzima Nitrosoglutación Reductasa (GSNOR)

Para este análisis se utilizó una técnica que se basa en la medición de la oxidación del NADH espectrofotométricamente. En la región hipocampal se encontró un aumento en la actividad de la enzima Nitrosoglutación Reductasa en el grupo de estrés perinatal (0.9241715 nmolminmg de prot +/- 0.15886044) comparado contra el grupo control (0.3900709 nmolminmg de prot +/- 0.02537661) $p < 0.05$ (Figura 32).

Ahora bien en los ganglios basales también se encontró un aumento en la actividad de dicha enzima en los grupos de estrés postnatal (0.432475 nmolminmg de prot +/- 0.0283356) y perinatal (0.3384752

nmol/min/mg de prot \pm 0.01248160) en comparación con el grupo control (0.2808678 nmol/min/mg de prot \pm 0.01267) $p < 0.05$ (Figura 33). Y por último de este biomarcador en la región de la corteza prefrontal se encontró una disminución en la actividad de la enzima en el grupo de estrés perinatal (0.3354279 nmol/min/mg de prot \pm 0.12354981) comparado con el grupo control (0.4459495 nmol/min/mg de prot \pm 0.07972905) $p < 0.05$ (Figura 34).

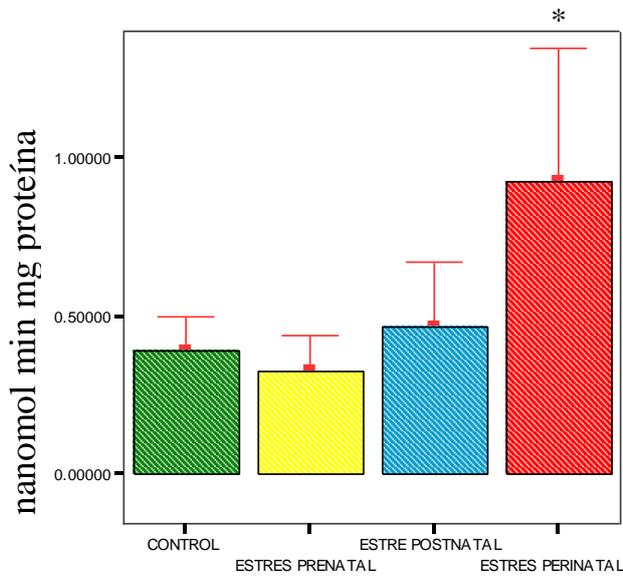


Figura 32. Actividad de la enzima Nitrosoglutación reductasa en hipocampo

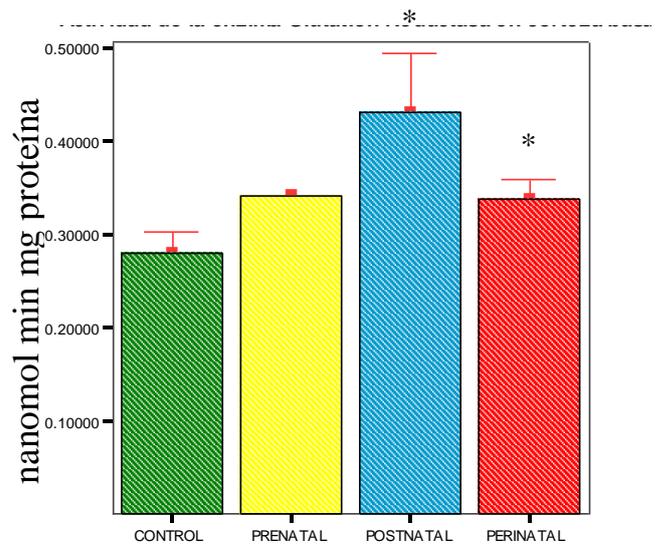


Figura 33. Actividad de la enzima Nitrosoglutación reductasa en ganglios basales

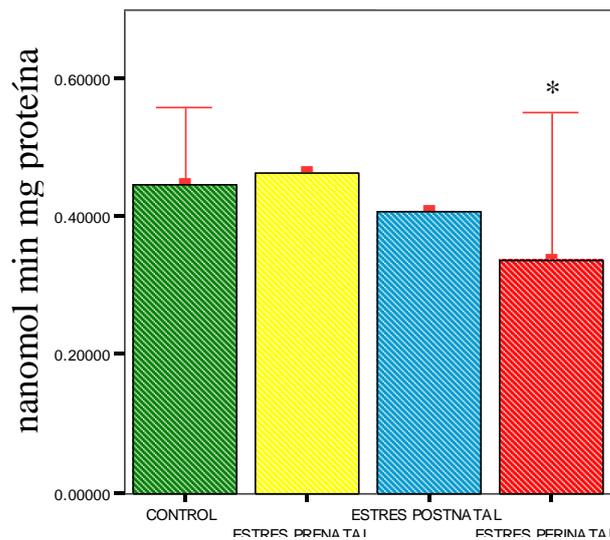


Figura 34. Actividad de la enzima Nitrosoglutación reductasa en corteza prefrontal

Cuantificación de la actividad de enzima Nitrosoglutatión reductasa para lo cual se utilizó un método espectrofotométrico basado en la oxidación del NADH. Las gráficas muestran los 4 grupos de estudio: en verde el grupo control, en amarillo el grupo de estrés prenatal, en azul el grupo de estrés postnatal y finalmente en rojo el grupo de estrés perinatal. Se muestra con * aquellos grupos que tuvieron una $p < 0.05$ por lo que son considerados como significativos. Se utilizó la prueba estadística de hipótesis de Kruskal Wallis.

Análisis de resultados

Sulfhidrilos totales

El glutatión es altamente abundante en todos los compartimientos celulares y es el antioxidante más soluble. El cociente del glutatión reducido y su forma oxidada, GSH/GSSG respectivamente, son un determinante de estrés oxidativo. La función de los sulfhidrilos es la de actuar como antioxidantes. Un antioxidante con función biológica disminuye o evita la oxidación del sustrato toda vez que resulta un agente reductor más potente. En lo concerniente a los sulfhidrilos el glutatión es el principal antioxidante que utiliza a la cisteína como el grupo que contiene el grupo tiol necesario para la acción antioxidante.

A diferencia de lo encontrado en los ganglios basales, a nivel de plasma sanguíneo, las concentraciones de sulfhidrilos se vieron disminuidas en los grupos de ratas estresadas, principalmente en las estresadas prenatal y perinatalmente. Este resultado, comparado con el trabajo de Cem Yasar Sanhal, et al.⁶ sustenta la noción de que el estrés emocional puede conducir a un estrés oxidativo sistémico, donde se pone en evidencia que la acción de estrés psicológico antes de nacer y después de nacer repercute directamente y de manera significativa en este parámetro de estrés oxidativo. En el cerebro de las ratas en este experimento parece ser que los mecanismos de protección cerebrales en este biomarcador actuaron de manera eficiente por lo que el estrés psicológico no modificó la cantidad de sulfhidrilos presentes. Es posible que los tratamientos de estrés psicológico, puedan, a nivel de sistema nervioso central, inducir respuestas bioquímicas compensatorias como la de aumentar los mecanismos antioxidantes como los tioles, lo cual podría explicar los resultados obtenidos. Esta posibilidad podría sustentarse con estudios del metabolismo del glutatión, tales como las actividades de: Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa y Glutatión reductasa ya que la primera de ellas es la enzima más importante generadora de NADPH, coenzima que se requiere para mantener al glutatión reducido por la acción de la Glutatión reductasa.

Capacidad antioxidante

Los sistemas han desarrollado complejos sistemas antioxidantes como la superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa (enzimáticos); así como la albumina, ceruloplasmina, ferritina, ácido ascórbico, glutatión, alfa tocoferol, ácido úrico, etc.

En el plasma de las ratas tratadas se encontró que el doble hit de estrés psicológico, es decir en el grupo de estrés perinatal, produjo una disminución en la capacidad antioxidante a nivel sistémico, lo cual es un indicador, de acuerdo con el trabajo de Mustafa⁸, que podría sustentar la noción de la presencia de estrés oxidativo a nivel sistémico. Por cuestiones de la poca cantidad de muestra esta misma prueba no se pudo realizar en las distintas regiones cerebrales analizadas, aunque de manera muy arriesgada podría inferirse que si hay una disminución a nivel sistémico también pudiera ser que a nivel cerebral también se dé el mismo fenómeno. Para lo cual es necesario continuar con los trabajos de investigación que permitan resolver las dudas que surgieron en la realización del presente trabajo.

Daño a proteínas

Los radicales libres producen alteraciones en las lipoproteínas de baja densidad por oxidación, provocando reacciones citotóxicas en las células endoteliales, pérdida del reconocimiento por el receptor concomitante con la consecuente fagocitosis y acumulación de lipoproteínas modificadas en los macrófagos.

Dicha prueba se realizó en plasma únicamente por la misma razón que en la prueba pasada. Y en plasma no se encontró evidencia de que se hidroxilaran las proteínas a nivel sistémico excepto en el grupo de estrés postnatal donde contrario a lo que se esperaba la cantidad de proteínas hidroxiladas disminuyó, aunque el mecanismo por el cuál sucedió este fenómeno no está del todo claro. Como sugerencia para un trabajo a futuro podría considerarse realizar la prueba con la técnica de cuantificación de

aminoácidos en plasma empleando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia utilizada por Ortega⁵⁸ para confirmar los resultados obtenidos.

Malondialdehido

El Malondialdehido (MDA) es de los principales productos de la lipoperoxidación y es producido en el metabolismo de ácidos grasos poliinsaturados por acción enzimática. En muchas patologías las altas concentraciones de MDA se ocupa como indicador para el diagnóstico. El MDA es uno de los biomarcadores de estrés oxidativo más comunes y ampliamente utilizado.

El cerebro contiene una considerable cantidad de lípidos, particularmente en la llamada vaina de mielina que es una estructura organizada por lipoproteínas cuya función es la de optimizar la transmisión del potencial de acción. Dentro de la determinación de lipoperoxidación mediante la cuantificación de MDA en el presente trabajo se encontró que tanto en hipocampo como en corteza prefrontal aumentó la concentración de este biomarcador en los grupos que recibieron doble carga de estrés psicológico es decir antes y después del nacimiento. Por lo que podría pensarse que debido a la lipoperoxidación se podría dar la formación de radicales hidróxido que conduzcan al estrés oxidativo como lo plantea Tsikas Dimitrios, et al.¹²

Por otro lado, contrariamente a lo esperado, se encontró que en la región de los ganglios basales en los grupos estresados perinatalmente, la concentración de MDA fue menor que en el grupo control. Un comportamiento inverso al de los sulfhidrilos, sugiriendo una relación inversa entre estos parámetros, en esta estructura cerebral en particular aunque no se conoce con claridad la razón.

Nitratos y nitritos

El óxido nítrico (NO) es un mediador endógeno de numerosos procesos fisiológicos que van desde la regulación de funciones cardiovasculares, al

ser secretado por células endoteliales, y como neurotransmisor. También producido por los macrófagos, es un potente agente antimicrobial citotóxico.¹⁴

De las tres regiones analizadas, la corteza prefrontal tuvo las concentraciones más bajas de nitratos, en las ratas controles. Esto sugiere que en esta región, la formación endógena de nitratos/nitritos es menor que en las otras dos regiones analizadas.

En relación al efecto del estrés en los nitratos, en corteza basal y corteza prefrontal se encontró un aumento en las concentraciones de óxido nítrico en los grupos de estrés postnatal y perinatal respectivamente; indicando que el estrés induce aumento en la producción de óxido nítrico en estas regiones del cerebro, pero no en Hipotálamo. La sobre expresión de las óxido nítrico sintasas inducibles y la consecuente sobreproducción de óxido nítrico (detectado mediante la cuantificación de nitratos y nitritos) ha sido implicado como promotor del desarrollo de diversas enfermedades. El efecto indirecto del óxido nítrico se presenta cuando este es producido en grandes cantidades (en general por la iNOS), tal condición puede generar la formación de otros productos como las especies reactivas de óxidos de nitrógeno ERON, las cuales participan en los procesos fisiopatológicos relacionados con la producción excesiva del NO y de especies reactivas de oxígeno de acuerdo con lo reportado por Hicks J. et al.³

A diferencia a lo que se encontró en cerebro, las muestras de plasma tuvieron concentraciones menores en los grupos sometidos a estrés. Esto resultados indican que, a nivel sistémico, la formación endógena de óxido nítrico, resulta afectada por el estrés como lo menciona Miranda M, et al¹⁵. Esto podría deberse a una modificación por parte de los mecanismos que se activan en un sistema estresado, como lo es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, sobre las isoenzimas óxido nítrico sintasas.

Actividad de la enzima Arginasa

La actividad de la enzima arginasa en plasma sanguíneo se vio incrementada en los grupos sometidos a estrés, incremento que fue más acentuado en el grupo de estrés perinatal. Se considera que el papel

fisiológico de las arginasas extrahepáticas es el de regular la disponibilidad del aminoácido L-arginina para la biosíntesis de óxido nítrico, de manera que un incremento en la actividad de esta enzima no sólo disminuye la síntesis de óxido nítrico, sino también puede inducir un estado de desacoplamiento de las óxido nítrico sintasas (NOS), caracterizado por un disminución en la síntesis de óxido nítrico y un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno, tal como sucede en las condiciones asociadas a los procesos inflamatorios severos. Por lo anteriormente expresado, el incremento en la actividad de arginasa en los grupos estresados, puede muy bien estar relacionado con la disminución de los nitritos y nitratos en las muestras de plasma de estos grupos de ratas.

Ahora bien de las regiones analizadas en el cerebro, se encontró que en la corteza basal se hace evidente que los sujetos que fueron estresados antes de nacer y después de nacer también elevaron la actividad de la enzima arginasa produciéndose un efecto sinérgico por haber recibido estrés en ambos momentos. Esta afirmación está sustentada en el trabajo de Corraliza, et al.¹⁰ Pero a diferencia de lo que ocurrió en plasma en esta región no disminuyó la cantidad de nitritos y nitratos.

Actividad de la enzima Nitrosoglutación reductasa

El S-nitrosotiol y S-nitroso glutatión (GSNO) existen en los tejidos de rata y ratón incluido el cerebro. La abundancia de proteínas S nitrosotioles proteicos se encuentran en equilibrio con GSNO y este se encuentra regulado por la enzima GSNOR reductasa, por la enzima tioredoxin reductasa y además de la enzima carboxil reductasa. Por lo que una elevada acción está enzima disminuirá los niveles de GSNO disponibles permitiendo un ambiente de estrés oxidativo según el trabajo de Limin Liu et al¹⁶

Los resultados muestran que el estrés perinatal aumentó la actividad de esta enzima en la región hipocampal y en la corteza basal. Esto sugiere fuertemente que el estrés altera de manera importante el metabolismo de los S-nitrosotioles, ya que esta enzima regula (inversamente) los procesos de S-nitrosación de proteínas y con ello, muchas de las acciones que el

óxido nítrico realiza comparado con el trabajo de Jensen, et al¹⁹. Aunque dicha situación no ocurrió en la corteza prefrontal donde por el contrario disminuyo la actividad.

Conclusión

En el presente trabajo se puso de manifiesto que el estrés psicológico en etapas tempranas de la vida en el modelo animal estudiado es un importante factor que tiene la capacidad de desencadenar mecanismos que conducen a la condición conocida como estrés oxidativo y modificaciones en el metabolismo del óxido nítrico tanto a nivel sistémico como a nivel cerebral.

Es importante mencionar también que en la mayoría de los casos donde se observa un cambio notorio en los parámetros bioquímicos es en aquellos sujetos donde se aplicó un doble estímulo estresor, por lo que para lograr vencer las medidas antioxidantes del sistema de defensa tienen que darse las condiciones específicas para que dicho fenómeno ocurra.

Comentarios finales

Es bien sabido que el ritmo al que se desarrolla la sociedad nos conduce por un camino donde, día a día, el estrés psicológico va en aumento y con ello diversos padecimientos aparecen aún en etapas tempranas del desarrollo. Por esta razón es necesario considerar realizar muchos más estudios sobre el tema, en primer lugar para poder conocer a fondo la etiología y mecanismos del estrés oxidativo y en segundo para poder diseñar una posible terapia tanto farmacológica, quizá con antioxidantes o con inhibidores de la arginasa, aunada con una terapia psicológica que ayude a las madres a manejar el estrés psicológico.

Referencias bibliográficas

1. Spiers G., Hsiao-Jou Cortina Chen, Conrad Sernia and Nickolas A. Lavidis. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative. *Front Neurosci.* 2015; 8 : 1-6.
2. Birben E., Umit M, Cansin Sackesen , Serpil Erzurum and Omer Kalayci, Oxidative Stress and Antioxidant Defense *WAO Journal* 2012; 5:9–19.
3. Hicks J. Grenfell A. Olivares. I, Medina R. Especies reactivas del oxígeno (ERO): bioquímica inorgánica y biomedicina. En: *Bioquímica. Segunda edición: Mc Graw Hill ; 2007. 689-708.*
4. Torequl I. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders *Neurological Research*, 2016; disponible en <http://dx.doi.org/10.1080/01616412.2016.1251711>
5. Aashiq Hussain Bhata, Khalid Bashir Dara, Suhail Aneesa, Mohammad Afzal Zargarb, Akbar Masoodb, Manzoor Ahmad Sofia, Review Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed Pharmacother.* 2015; 74:101-110.
6. Cem Yasar Sanhal, et al. An alternative method for measuring oxidative stress in intrahepatic cholestasis of pregnancy: thiol/disulphide homeostasis. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017. Disponible en <https://doi.org/10.1080/14767058.2017.1319922>
7. Jocelyn, P. C., Spectrophotometric assay of thiols. *Methods Enzymol.* 1987; 143: 44-67.
8. Mustafa O Zyu Rek .Res,At Apak, Kubilay Gu C, Lu, Saliha Esi N Karademi R, & Mehmet Altun. Total antioxidant capacity assay of human serum using copper(II) neocuproine as chromogenic oxidant: The CUPRAC method. *Free Radic Res.* 2005; 39(9): 949–961

9. Giese SP, Simpson JA, Charlton TS, Duncan MW, Dean RT. Protein-bound 3,4-dihydroxyphenylalanine is a major reductant formed during hydroxyl radical damage to protein Biochemistry. 1993 May 11;32(18):4780-6
10. Paz Mercedes A., Rudolf Flickiger S, Andra Boakll, Herbert M. Kaganll, and Paul M. Gallop. Specific Detection of Quinoproteins by Redox-cycling Staining. The Journal Of Biological Chemistry. 1991; 266. 689-692.
11. Fluckinger et al. Glycine-dependent redox cycling and other methods for PQQ and quinoprotein detection. En: Principles of applications of quinoproteins. New York: Marcel Dekker; 1993. 331-337
12. Tsikas Dimitrios . Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological Challenges. Anal Biochem. 2017; 524: 13-30.
13. Gérard-Monnier. Dominique, Irene Erdelmeier, Kheira Re'gnard, Nathalie Moze-Henry, Jean-Claude Yadan, and Jean Chaudie`re Reactions of 1-Methyl-2-phenylindole with Malondialdehyde and 4-Hydroxyalkenals. Analytical Applications to a Colorimetric Assay of Lipid Peroxidation. Chem. Res. Toxicol. 1998; 11: 1176-1183
14. Corraliza I.M. Campo a G. Soler. M. Modolell. Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod. J Immunol Methods. 1994; 174: 231-235.
15. Miranda Katrina M., Michael G. Espey, and David A. Wink. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. Nitric Oxide. 2001; 5: 62-71.
16. Limin Liu*², Alfred Hausladen², Ming Zeng², Loretta Que², Joseph Heitman*³ & Jonathan S. Stamler*^{2¶} A metabolic enzyme for S-nitrosothiol conserved from bacteria to humans. Nature. 2001; 410 : 490-493

17. Giustarini Daniela, Aldo Milzani, Isabella Dalle-Donne , Ranieri Rossi. Detection of *S*-nitrosothiols in biological fluids: A comparison among the most widely applied methodologies. *J. Chromatogr. B.* 2007. 851:124–139
18. Jensen DE, Belka GK, Du Bois GC. *S*-nitrosoglutathione is a substrate for rat alcohol dehydrogenase class III isoenzyme. *Biochem J.* 1998; 331: 659-668.
19. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193(1):265-75.
20. Venereo Gutierrez. Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit* 2002;31(2):126-33
21. Joah Aliancy . W. Daniel Stamer . Barbara Wirostko. A Review of Nitric Oxide for the Treatment of Glaucomatous Disease. *Ophthalmol Ther.* 2017. Disponible en: DOI 10.1007/s40123-017-0094-6
22. Junghee Lee , Hoon Ryu, Robert J. Ferrante, Sidney M. Morris, Jr., and Rajiv R. Ratan. Translational control of inducible nitric oxide synthase expression by arginine can explain the arginine paradox. 2003; 100: 4843-4848.
23. Marcelo G. de Oliveira,* Sílvia M. Shishido, Amedea B. Seabra, and Nelson H. Morgon. Thermal Stability of Primary *S*-Nitrosothiols: Roles of Autocatalysis and Structural Effects on the Rate of Nitric Oxide Release. *J. Phys. Chem. A* 2002, 106, 8963-8970.
24. Schiavone S, Jaquet V, Trabace L, Krause K-H. Severe Life Stress and Oxidative Stress in the Brain: From Animal Models to Human Pathology. *Antioxid Redox Signal.* 2013. 18(12):1475–90.
25. Selye H. 1946. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol*; 6:117-184.
26. Selye, H. 1952. Allergy and the general adaptation syndrome. *International Archives of Allergy and Immunology*, 3(4), 267–278.

- 27.. Selye H.1956,The Stress of life, Journal of Bone & Joint Surgery - American Volume: April 1957 - Volume 39 - Issue 2 - ppg 479.
- 28.. Selye H. Stress sans détresse. La Presse. The stress of my life. A scientist's memoirs, McClelland and Stewart, 1977
- 29.Cristina, N & Andrea, N. Hormonas Catecolamínicas Adrenales. Disponible en:<https://med.unne.edu.ar/sitio/multimedia/imagenes/ckfinder/files/files/Carrera-Medicina/BIOQUIMICA/catecolaminas.pdf>
- 30.Contra, H. S., Estrada, L. R., Chávez, A. G., & Hernández, H. Artemisa El sistema renina-angiotensina-aldosterona y su papel funcional más allá del control de la presión arterial. Revista mexicana de cardiología. 2008. 19: 21-29.
- 31.Moberg GP. Biological response to stress: Implications for animal welfare. Moberg GP, Mench JA. 2000: 1–21.
- 32.Munck A, Guyre PM, Holbrook NJ. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relations to pharmacological actions. Endocr Rev. 1984;5(1):25–44.
- 33.García-Cáceres C, Lagunas N, Calmarza-Fon I, Azcoitia I, Diz-Chaves Y, García-Segura LM, Baquedano E, Frago LM, Argente J, Chowen JA. Gender differences in the long-term effects of chronic prenatal stress on the HPA axis and hypothalamic structure in rats. Psychoneuroendocrinology. 2010; 35(10):1525-1535.
- 34.Fuente-Martín E, Granado G, García-Cáceres C, Sánchez-Garrido MA, Frago LM, Tena-Sempere M, Argente J, Chowen JA. Early nutritional changes induce sexually dimorphic long-term effects on body weight gain and the response to sucrose intake in adult rats. Metabolism. 2012; 61(6):812-822
35. Pierre Pichot. DSM-IV Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. Versión española de la cuarta edición de la obra original en lengua inglesa Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders: DSM-IV. Barcelona: Masson;1995.

36. Strelakova T, Couch Y, Kholod N, Boyks M, Malin D, Leprince P, Steinbusch HM. Update in the methodology of the chronic stress paradigm: internal control matters. *Behav Brain Funct.* 2011;7:9.
37. Maldonado-Duran M. y Lartigue T. Fenómenos de la “programación” in utero: efectos de alto nivel de estrés y de la desnutrición durante el embarazo. *Perinatología y Reproducción Humana.* 2008. 22(1):26-35.
38. Rice F, Jones I, Thapar A. The impact of gestational stress and prenatal growth on emotional problems in offspring: a review. *Acta Psychiatr Scand.* 2007 115(3):171–83.
39. Arnaud Charila, David P. Laplanteb , Cathy Vaillancourtc , Suzanne King. Prenatal stress and brain development. *Brain research reviews.* 2010; 65: 56-79.
40. Krause B, Sobrevia L, Casanello P, Uauy R, Camuerga E, Barrer D. Papel de la placenta en la programación fetal de las enfermedades crónicas del adulto. En: Uauy R, Camuerga E, Barrer D, et al., Impacto del crecimiento y del desarrollo temprano sobre la salud y bienestar de la población. 2009. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/texcom/cd050833/krause.pdf>
41. O'Connor TG, Heron J, Golding J, Beveridge M, Glover V. 2002. Maternal antenatal anxiety and children. behavioural/emotional problems at 4 years. Report from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children. *The British Journal of Psychiatry.* 180:502-508.
42. Entringer S, Buss C, Swanson JM, Cooper DM, Wing DA, Waffarn F and Wadhwa PD. Fetal programming of body composition, obesity, and metabolic function: the role of intrauterine stress and stress biology. *Journal of nutrition and metabolism.* 2012:632-548.
43. Barker DJP. 1990. The fetal and infant origins of adult disease. *British Medical Journal.* 301:1111.
44. Calkins K; Devaskar SU. Fetal Origins of Adult Disease, *Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 2011 July ; 41(6): 158–176.

45. Xin F, Susiarjo M, Bartolomei MS; 2015. Multigenerational and transgenerational effects of endocrine disrupting chemicals: A role for altered epigenetic regulation; *Seminars in Cell & Developmental Biology*; 43 (2015) 66-75.
46. Geneser, F., "Histología, sobre bases biomoleculares" 4ª ed, Editorial médica Panamericana, Barcelona 2007 Pag 854-864.
47. Kierszenbaum, A.L., "Histology and Cell Biology, An introduction to Pathology", Mosby publishing, St Louis 2002 pag. 453-467.
48. Constantine Tsigos, George P. Hypothalamic–pituitary–adrenal axis, neuroendocrine factors and stress *Journal of Psychosomatic Research*. 2002; 53: 865– 871
49. Miranda van Bodegom, Judith R. Homberg and Marloes J. A. G. Henckens Modulation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Early Life Stress Exposure. *Frontiers in neuroscience*. 2007; 11: 1-33
50. Jereme G. Spiers, Hsiao-Jou Cortina Chen , Conrad Sernia and Nickolas A. Lavidis. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal stress axis induces cellular oxidative stress. *Frontiers in neuroscience*. 2015; 8: 1-6.
51. Rasheed N, Ahmad A, Al-Sheeha M, Alghasham A, and Palit G. Neuroprotective and anti-stress effect of A68930 in acute and chronic unpredictable stress model in rats. *Neurosci*. 2011; 504: 151–155.
52. Sorce S and Krause K-H. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2481–2504.
53. Costantini D, Marasco V, and Møller A. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *J Comp Physiol B*. 2011;181: : 447–456.
54. Sorce S and Krause K-H. NOX enzymes in the central nervous system: from signaling to disease. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11: 2481–2504.

55. You J, Yun S, Nam K, Kang C, Won R, and Lee E. Mechanism of glucocorticoid-induced oxidative stress in rat hippocampal slice cultures. *Can J Physiol Pharmacol* 2009; 87: 440–447.
56. Darnaudéry M, Maccari S. 2008. Epigenetic programming of the stress response in male and female rats by prenatal restraint stress. *Brain Research Reviews*. 57:571-585.
57. Imagen tomada de https://www.researchgate.net/figure/Figura-5-Metodo-de-restriccion-de-movimientos-e-iluminacion-Se-muestran-tres-ratas_fig3_311667540
58. Ortega L. Cuantificación de aminoácidos en plasma empleando Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2009; 43 (4): 647-61.