



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

PSICOLOGÍA

**“EFECTO DE LA *Spirulina maxima* EN LOS INDICADORES DEL ESTADO  
ANTIOXIDANTE EN UN MODELO DE ESTRÉS AGUDO”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
**LICENCIADA EN PSICOLOGÍA**

P R E S E N T A

MARÍA TERESA JUÁREZ AGUILAR

JURADO DE EXAMEN

TUTOR:

Mtro. ALFONSO SERGIO CORREA REYES

COMITÉ:

Mtra. MA DEL REFUGIO CUEVAS MARTÍNEZ

Dr. CARLOS GONZALO FIGUEROA LÓPEZ

Dr. MARCO ANTONIO JUÁREZ OROPEZA

Dra. BERTHA RAMOS DEL RÍO



México, D.F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 10 del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, bajo la tutoría del Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza.

Se agradece el apoyo otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) No. IN205410 para la realización del presente trabajo.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco:

Al Dr. Marco Antonio Juárez por permitirme realizar investigación en su laboratorio, por su confianza, consejos y enseñanzas.

Al Mtro. Alfonso Sergio Correa y a la Mtra. Ma Refugio Cuevas (miembros del comité tutorial) por su apoyo, enseñanzas y consejos, mismos que han contribuido significativamente a mi formación profesional.

Al Dr. Carlos Gonzalo Figueroa y a la Dra. Bertha Ramos (miembros del jurado) por sus acertados comentarios y sugerencias, mismos que me ayudaron a enriquecer y concluir el presente trabajo.

A la Dra. Leticia Verdugo por su apoyo, enseñanzas y por las facilidades brindadas para la utilización de las jaulas de restricción.

A la Dra. Patricia Torres por su consejo, apoyo y por la enseñanza de las técnicas de laboratorio.

A mi familia por su interés, consejos, experiencias vividas y sobre todo por su apoyo incondicional.

A Samuel Vallejo por su apoyo incondicional, consejos y por todas las experiencias que hemos vivido.

A mis amigos (Katya, Viri, Denis, Karina, Cristina, Juan, Kenia, Moni, entre otros) por su apoyo y por todos los momentos que hemos vivido juntos.

A mis compañeros de laboratorio (Alan, Aldo, Iván, Jesús, Joseluis, Liz y Nely) por su interés, enseñanzas y aquellarres.

## ÍNDICE

<b>Título</b>	<b>Página</b>
Resumen .....	6
Introducción .....	8
Capítulo 1. Estrés .....	11
1.1 Definiciones	
1.2 Modelos	
1.2.1 Modelo Basado en la Respuesta	
1.2.2 Modelo Basado en el Estímulo	
1.2.3 Modelo Procesual	
1.3 Fisiología	
1.4 Clasificaciones	
Capítulo 2. <i>Spirulina maxima</i> .....	24
Capítulo 3. Sistemas Antioxidantes de Defensa .....	29
Planteamiento del Problema .....	32
Justificación	
Pregunta de Investigación	
Objetivo General	
Objetivos Particulares	
Metodología .....	34
Hipótesis	
Definición de Variables	
Diseño Experimental	
Muestra	
Consideraciones Éticas	
Materiales y Equipo	
Procedimiento	
Obtención del Material Biológico	
Análisis Estadístico	
Pruebas	

Método para Determinar Carbohidratos	
Metodología para Determinar Glucosa	
Método para Determinar Lípidos	
Metodología para Determinar Colesterol Total	
Metodología para Determinar Triacilgliceroles	
Metodología para Determinar Ácidos Grasos Libres	
Método para Determinar Estrés Oxidativo	
Determinación de Superóxido Dismutasa	
Determinación de Catalasa	
Determinación de Glutación Reducido	
Determinación de Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico	
Método para Determinar Estrés Físico	
Metodología para Determinar Corticosterona	
Método para Determinar Proteínas	
Metodología para Determinar Proteínas	
Resultados .....	46
Plasma	
Hígado	
Discusión y Conclusión .....	57
Referencias .....	61

## **EFFECTO DE LA *Spirulina maxima* EN LOS INDICADORES DEL ESTADO ANTIOXIDANTE EN UN MODELO DE ESTRÉS AGUDO**

El objetivo de este estudio fue conocer si la *Spirulina maxima* ayuda a disminuir las respuestas fisiológicas negativas (indicadores de estrés oxidativo y del metabolismo de lípidos), al aumentar las defensas antioxidantes ante un estrés agudo, en ratas, inducido por la Restricción de Movimiento (RM) durante 2h, mismas que se evaluaron en plasma e hígado. El estudio se llevó a cabo en 48 ratas macho de la cepa Wistar, de aproximadamente dos meses de edad (al inicio del estudio), que fueron asignadas a cuatro grupos: el primero no estuvo expuesto a tratamientos, el segundo únicamente se sometió a la dieta de *Spirulina maxima* al 5%, el tercero sólo se sometió a la RM y el cuarto grupo se alimentó con *Spirulina maxima* al 5% y se sometió a la RM. Los grupos tercero y cuarto se dividieron en dos subgrupos, el primero se sacrificó inmediatamente y el segundo a las 24h post-RM. Las diferencias entre grupos se analizaron mediante el programa GraphPad Prism, v. 4, se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba post-hoc Bonferroni, considerando significativop $\leq$ 0.05. Se encontró que la *Spirulina maxima* atenúa los cambios inducidos por la RM en los indicadores de estrés oxidativo y en el metabolismo de lípidos, particularmente en la CAT y SOD hepática y en la concentración de CT hepático. Considerando el análisis de los indicadores de estrés oxidativo, en conjunto, se demuestra que la *Spirulina maxima* aumenta las defensas antioxidantes. Al mostrar una atenuación en los cambios fisiológicos inducidos por el estrés, la *Spirulina maxima* podría ser útil en algunos padecimientos asociados a situaciones estresantes.

*Palabras clave:* SOD, CAT, GSH, TBARS, TAG, Colesterol Total, Ácidos Grasos Libres, Glucosa, plasma e hígado.

## **EFFECTS OF *Spirulina maxima* ON THE ANTIOXIDANT - STATE INDICATORS IN AN ACUTE STRESS MODEL**

The aim of the present study was to evaluate if the *Spirulina maxima* helps diminish the negative physiological responses (indicators of oxidative stress and lipid metabolism), by increasing the antioxidant defenses, due to an acute stress induced by Movement Restriction (MR), for 2h, in rats, which were evaluated in plasma and liver. Male Wistar rats of approximately two months of age (at the beginning of the study), were assigned to four groups (12 rats/group): the first group was not exposed to treatments; the second group was under the diet of *Spirulina maxima* 5%; the third group was only under the MR; finally, the fourth group was fed with *Spirulina maxima* 5% and was under the MR. Afterward, the groups three and four were divided in two sub-groups: the first one, was sacrificed immediately post-MR and the second one, 24h post-MR. The GraphPad Prism, v. 4 package was used in order to analyze the differences among experimental groups using the one-way ANOVA test followed by Bonferroni's post-hoc test; values lower than  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant. The *Spirulina maxima* attenuates the changes induced by the MR on the oxidative stress indicators and on the lipid metabolism, particularly in liver CAT and liver SOD, as well on the liver Cholesterol. Taking into account all the oxidative stress indicators, altogether, the *Spirulina maxima* increase the antioxidant defenses. Since the *Spirulina maxima* induced a decrease in the physiological responses due to an acute stress, it could be useful in some diseases associated to stressing situations.

*Key words:* SOD, CAT, GSH, TBARS, TAG, Cholesterol, Free Fatty Acids, Glucose, blood plasma and liver.



## **INTRODUCCIÓN**

Para la OMS (2007), la salud mental se define como un estado de bienestar en el cual el individuo es consciente de sus propias capacidades, puede afrontar las tensiones normales de la vida, puede trabajar de forma productiva y fructífera y es capaz de hacer una contribución a su comunidad.

En el ámbito de la psicología ha habido autores que han considerado al estrés como un estímulo, otros lo han considerado como respuesta e incluso otros como interacción entre el sujeto y el medio. Actualmente todos coinciden en que es un proceso amplio, complejo y dinámico y atribuyen al estrés los llamados trastornos psicofisiológicos o tradicionalmente llamados trastornos psicósomáticos.

El estrés puede inducir directamente efectos psicológicos y fisiológicos que alteran la salud. También puede influir sobre la salud de una forma más indirecta a través de "conductas no saludables" (estrategias de afrontamiento nocivas como fumar, beber alcohol, conductas de riesgo) o bien inhibir conductas relacionadas con la salud, como el ejercicio físico.

López-Ibor & Valdés (2002) sostienen que existen factores psicológicos que afectan al estado físico. Algunas de las formas en que pueden afectar negativamente al estado físico son: sobre el curso de una enfermedad médica o en su tratamiento, precipitan o aumentan los síntomas de la enfermedad al provocar respuestas fisiológicas relacionadas con el estrés. De igual forma, consideran que existe evidencia razonable para sugerir una asociación entre los factores psicológicos y el estado físico. Los factores psicológicos y de comportamiento pueden afectar el curso de casi todas las categorías mayores de enfermedad, incluyendo a las enfermedades cardiovasculares, dermatológicas, endocrinológicas, gastrointestinales, neoplásicas, neurológicas, pulmonares, renales y reumáticas.

La respuesta al estrés es una acción inmediata e intensa, la cual implica la movilización de los recursos del organismo, la cual se produce ante situaciones que suponen importantes demandas para el individuo (Moreno, 2007). Esta reacción incluye respuestas fisiológicas (taquicardia, hiperventilación, etc.), cognitivas (aumento de la atención, etc.) y motoras (conductas de lucha o huida).

El estrés es una reacción fisiológica del organismo en el que entran en juego diversos mecanismos de defensa para afrontar una situación que se percibe como amenazante o de demanda incrementada. Algunos síntomas son: vasoconstricción periférica, midriasis, taquicardia, ralentización de la motilidad intestinal, liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), cortisol y encefalina, aumento en sangre de la cantidad circulante de glucosa, factores de coagulación, aminoácidos libres y factores inmunológicos. Este estado de alerta sostenido, desgasta las reservas del organismo y puede producir diversas patologías como: trombosis, ansiedad, depresión, inmunodeficiencia, dolores musculares, insomnio, trastornos de atención, diabetes, etc.

Aunque este tipo de respuestas son una ventaja adaptativa que nos permite afrontar alguna amenaza o reto que encuentre en nuestro entorno, estas pueden volverse perjudiciales para el organismo (ya que pueden desencadenar enfermedades), sobre todo cuando están presentes de forma constante e intensas en nuestra vida cotidiana.

En la actualidad, se está comprendiendo mejor el efecto que tiene sobre el cuerpo la exposición persistente a situaciones estresantes y se han atribuido gran cantidad de enfermedades físicas a la exposición prolongada al estrés (Williams & Cooper, 2004).

En el transcurso de la vida cotidiana se está sometido al estrés, ya sea en la escuela, el trabajo, etc. El estrés generalmente es el causante de varias enfermedades como la depresión, ya que no se está acostumbrado o no se sabe manejar. El estrés puede afectar a los individuos de todas las profesiones y edades, sin importar nacionalidad, antecedentes educativos o rol.

En México, más del 20% de la población económicamente activa padece estrés, afectando principalmente a personas con sobrepeso, obesidad y diabetes, por lo que

está considerado como un mal moderno por su elevada prevalencia en los centros de trabajo (Negrete, 2008).

Se considera que la falta de indicaciones y de estabilidad, los recortes de personal, las presiones financieras o laborales pueden ser factores de estrés en los trabajadores, lo que provoca efectos negativos en su salud. En cualquier ambiente de trabajo al menos 30% de los empleados presentan estrés laboral, y de éstos, los más proclives son los hombres y la población joven (La Jornada, 2009).

La combinación de altas demandas laborales y una escasa autonomía o control sobre el mismo, produce una tensión laboral o estrés crónico residual que se refleja en múltiples indicadores de salud, entre ellos, las enfermedades cardiovasculares. Dicha combinación de estresores o factores psicosociales se ha conocido bajo el nombre de “Modelo de Tensión Laboral” o “Modelo Demanda/Control” de Karasek (1998).

Actualmente, se le da mucha importancia a los medicamentos y se está acostumbrado a tomar fármacos por cualquier motivo, lo que ha generado cambios en el organismo y en su tolerancia a éstos. Por lo tanto, es interesante conocer si la *Spirulina maxima* disminuye los cambios fisiológicos al estar sometidos al estrés, específicamente al estrés agudo; ya que podría ser una opción para su tratamiento, siendo natural y no adictiva. Esta cianobacteria era conocida y usada por nuestros antepasados, quienes la obtenían del lago de Texcoco, donde crecía de forma natural.

En este estudio, se sometió a un grupo de ratas al estrés agudo provocado por la Restricción de Movimiento, con el fin conocer si la *Spirulina maxima* influye en el manejo de respuestas fisiológicas ante una situación estresante, y qué cambios fisiológicos resultan al aplicar el estrés agudo.

## Capítulo 1

### Estrés

El estrés es la respuesta automática y natural de nuestro cuerpo ante las situaciones que nos resultan amenazadoras o desafiantes. Nuestra vida y nuestro entorno, en constante cambio, nos exigen continuas adaptaciones; por lo cual, cierta cantidad de estrés es necesaria. En general tendemos a creer que el estrés es consecuencia de circunstancias externas a nosotros, cuando en realidad entendemos que es un proceso de interacción entre los eventos del entorno y nuestras respuestas cognitivas, emocionales y físicas. Cuando la respuesta de estrés se prolonga o intensifica en el tiempo, nuestra salud, nuestro desempeño académico o profesional, e incluso nuestras relaciones personales o de pareja se pueden ver afectadas. La mejor manera de prevenir y hacer frente al estrés es reconocer en qué momentos aumentan nuestros niveles de tensión y ante qué estímulos o situaciones.

#### 1.1 Definiciones

Algunas definiciones de estrés son:

Fontana (1992) piensa que es una exigencia a las capacidades de adaptación de la mente y el cuerpo, y que cuando estamos sometidos a éste suceden gran cantidad de reacciones fisiológicas, mismas que pueden dañar al organismo si se les permite continuar durante mucho tiempo.

Williams & Cooper (2004), creen que es una respuesta personal y es el resultado negativo de un desequilibrio entre la presión y la capacidad de la persona para afrontarla. De igual forma, opinan que el estrés es un efecto negativo que ocurre cuando la presión percibida en un individuo supera su capacidad percibida de afrontamiento.

El estrés es considerado como un estímulo, interno o externo, amenazante para la supervivencia del individuo y que provoca cambios fisiológicos, endócrinos y

conductuales. Los principales elementos del sistema nervioso central (SNC) que median la respuesta al estrés son: el sistema nervioso autónomo (SNA), el eje hipotálamo-hipófisis adrenal (HHA) y el sistema límbico (Ramos & Mormede, 1998).

López (2005) lo define como la situación en la cual las demandas externas e internas superan la capacidad de respuesta. Provocando así la alarma orgánica, la cual desencadena la activación desproporcionada de todos los órganos y sistemas involucrados en el estrés, especialmente sobre los sistemas nervioso, cardiovascular, endócrino e inmunológico, produciendo un desequilibrio psicofísico y la enfermedad.

Ya que existen numerosas definiciones para describir al estrés, las cuales abarcan diferentes puntos de vista, se considera que la definición de López (2005) es la más adecuada para los propósitos del presente trabajo, ya que considera los aspectos fisiológicos inmediatos y tardíos de la respuesta a una situación estresante.

## **1.2 Modelos**

Diferentes modelos han tratado de explicar la relación que existe entre estrés y enfermedad. En este trabajo se tratarán 3 modelos: el primero se basa en la respuesta, el segundo en el estímulo y finalmente el tercero en los modelos procesuales.

### **1.2.1 Modelo Basado en la Respuesta**

A raíz de sus experimentos sobre la comunicación hormonal y el cuerpo humano, Selye comenzó a destacar la posible relación de las respuestas fisiológicas de estrés y las enfermedades.

Para él, estrés era una respuesta no específica del organismo que puede ser provocada por cualquier estresor medioambiental que atente contra la homeostasis o equilibrio del organismo (Moreno, 2007).

Para explicar nuestra reacción ante los estresores, las reacciones se dividen en tres fases: reacción de alarma (A), fase de resistencia (B) y fase de agotamiento (C) y las llamó Síndrome de Adaptación General (GAS) (Selye, 1973).

La reacción de alarma provoca movilización de las defensas del organismo para combatir al estresor mediante la acción del sistema nervioso simpático. La fase de resistencia es aquella en la que el organismo se adapta al estresor, esta es diferente en cada organismo. En la fase de agotamiento la capacidad de resistencia del organismo se agota por lo cual se produce un derrumbamiento físico que puede llegar a la muerte.

Durante la fase de resistencia el aspecto externo de la persona es normal, pero fisiológicamente el funcionamiento del cuerpo no lo es. Si el estrés se presenta de forma continua se producen cambios fisiológicos y hormonales (Moreno, 2007). Selye (1973) consideraba que la fase de resistencia estaba relacionada con las “enfermedades de adaptación” (úlceras pépticas, colitis, hipertensión, asma, cambios en el sistema inmunológico, etc.), las cuales se relacionan con un estrés continuo y persistente.

Fontana (1992), cree que debido a los estrechos vínculos entre la fisiología y la psicología, las fases fisiológicas A, B, C (planteadas por Selye) pueden corresponder casi exactamente con las fases psicológicas: pausa al enfrentar un estresor, para elaborar valoraciones cognoscitivas (A), resistencia al estresor (B), colapso psicológico (C). Entre más agotamiento físico sentimos por el estrés, más agotamiento psicológico, y viceversa (ver Tabla 1).

**Tabla 1. Relación de las Fases Psicológica y Fisiológica.** (tomado de Fontana, 1992)

<b>Fases</b>	<b>Psicológica</b>	<b>Fisiológica</b>	<b>Cambios Fisiológicos</b>
<b>A</b>	Valoraciones cognoscitivas	Etapa de Alarma: Alerta	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Taquicardia.</li> <li>• Pérdida de tono muscular.</li> <li>• Disminución de la temp. y presión sanguínea.</li> <li>• Comienza la segregación de adrenalina y corticoides.</li> <li>• Agrandamiento de la corteza suprarrenal</li> <li>• Hipertensión.</li> <li>• Hiperglucemia.</li> <li>• Diuresis.</li> <li>• Hipertermia</li> </ul>
<b>B</b>	Resistencia	Etapa de Resistencia: se desencadena la actividad autónoma	La mayoría de los cambios bioquímicos durante la reacción de alarma desaparecen y en algunos casos se invierten.
<b>C</b>	Colapso psicológico	Etapa de Agotamiento: se produce daño y ocurre el colapso	Si continua expuesto, el organismo pierde la adaptación adquirida. El agotamiento llega si el estresor es severo y prolongado y puede significar la muerte.

### 1.2.2 Modelo Basado en el Estímulo

En este modelo el estrés se identifica con aquellos estímulos ambientales que pueden llegar a perturbar el funcionamiento del organismo y establece una relación directa entre el estresor y la enfermedad.

Holmes es el principal responsable, desarrolló el Enfoque de los Sucesos Vitales, creó el primer método escalado para cuantificar el estrés social con el Inventario de Experiencias Recientes (SRE) y elaboró la escala de Estimación de Reajuste Social (SRRS).

Se entiende por suceso vital a los hechos o sucesos que son relevantes en la vida de las personas y que éstas reconocen como importantes para su cambio evolutivo. A lo largo de la vida los seres humanos atraviesan por distintas épocas (niñez, adolescencia, juventud, etc.) en las que les ocurren acontecimientos que recuerdan como decisivos.

Holmes & Rahe (1967) crearon el instrumento: Estimación de Reajuste Social, apoyado en datos empíricos, que intentaba medir los eventos negativos de los acontecimientos estresantes. Por medio de encuestas intentaron averiguar el valor estresante que una amplia población de sujetos atribuía a una serie de acontecimientos generalmente aceptados como agentes de cambio biográfico. La escala de reajuste social estaba compuesta por 43 acontecimientos que los sujetos tenían que puntuar tomando como referencia el suceso matrimonio, que recibía el valor inicial de 50.

A partir de la Estimación de Reajuste Social se creó el Inventario de Experiencias Recientes, el cual consta de un listado de 43 sucesos vitales, ordenados según el grado de reajuste requerido por el organismo para recuperar su homeostasis tras la aparición del suceso estresante. Los agentes estresantes no provocan la enfermedad de manera inevitable, sino aumentan el riesgo de contraer enfermedades o de que las defensas inmunológicas se vean superadas por ellas (Moreno, 2007).

### **1.2.3 Modelo Procesual**

Este modelo explica el origen del estrés a través de las relaciones establecidas en la interacción de la persona con su entorno. Los mayores exponentes de este modelo son Lazarus y Folkman con su Teoría Transaccional, esta teoría sugiere que la interpretación que el sujeto hace de los acontecimientos es la verdadera fuente del estrés sufrido y no el acontecimiento en sí mismo.

Para Lazarus & Folkman (1986), el proceso que media entre el acontecimiento y la reacción estresante no es la valoración cognitiva que el sujeto hace de la situación, la cual tiene 3 formas básicas (evaluación primaria, secundaria y reevaluación). La



evaluación primaria determina el significado del acontecimiento para el sujeto y existen cuatro tipos: amenaza (anticipación de daño), daño o pérdida (daño psicológico), desafío (amenaza que conlleva ganancia) y bienestar (no induce estrés). En la evaluación secundaria el sujeto valora sus propios recursos para enfrentar la situación. La Reevaluación involucra un proceso de retroalimentación mientras el sujeto se enfrenta a la situación. La respuesta de estrés sólo aparece si el sujeto valora la situación como potencialmente negativa y se siente incapaz de hacerle frente con sus recursos.

Este trabajo toma como marco de referencia al Modelo basado en la respuesta, ya que se valoraron los cambios en las respuestas fisiológicas (sistemas antioxidantes y metabolismo de lípidos) al estar sometidos al estrés agudo.

### **1.3 Fisiología**

Si no se logra equilibrar lo racional y lo emocional se desencadena un proceso en cascada a través del hipotálamo, el cual actúa sobre todos los órganos y sistemas del cuerpo produciendo los efectos del estrés. El proceso de cascada comienza cuando se percibe una amenaza y avanza sin parar a través de todos los pasos que mencionan más adelante.

Según Armario (2003), para que exista una reacción al estrés psicológico es necesario que el estímulo sea percibido, interpretado y que haya generado una respuesta por el SNC. Existen cuatro sistemas fisiológicos que han sido relacionados con el estrés psicológico; éstos son: SNA, el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (HHS), el sistema nervioso periférico y el sistema de endorfinas.

El hipotálamo es un órgano que comunica y dirige varias funciones de nuestro cuerpo. Recibe instrucciones del sistema límbico (vinculado con los sentimientos, emociones, el control de la alimentación y las conductas reproductivas) y de la corteza cerebral (es dónde se toman las decisiones y se realizan los razonamientos técnicos y analíticos) y las ejecuta a través de dos vías, la nerviosa y la hormonal.

La vía nerviosa también se conoce como sistema neurovegetativo o sistema nervioso autónomo, se divide en el sistema simpático y el parasimpático. El sistema simpático, se activa ante el estrés (produce un estímulo sobre todos los órganos y sus funciones a través de nervios al ser activado), permite la liberación de energía y nos prepara para la lucha o huida. El sistema parasimpático inhibe y ahorra energía. En una situación de tranquilidad, los sistemas simpático y parasimpático se encuentran en equilibrio.

Las reacciones de los órganos, al ser estimulados por el sistema simpático son: aumenta la frecuencia cardíaca del corazón (taquicardia); por lo cual se expulsa más sangre y oxígeno a los órganos que lo requieran y se eleva la tensión arterial. De esta forma, los músculos reciben más sangre (la cual es necesaria ante la situación de lucha o huida) y se tensionan para contraerse con mayor fuerza y aumentar la resistencia del cuerpo ante los traumatismos. Los bronquios se dilatan para que más oxígeno entre a los pulmones y a su vez más oxígeno entre a la sangre. El hígado produce y libera glucosa en la sangre (la cual es necesaria para la contracción muscular). Aumenta la actividad cerebral, la dilatación de las pupilas y la transpiración de la piel. Disminuye la circulación sanguínea en la piel para que aumente en los órganos que la necesitan más (músculo, corazón y cerebro). La glándula suprarrenal libera adrenalina, la cual refuerza el efecto de la estimulación del sistema simpático sobre los demás órganos.

La vía hormonal es responsable de los efectos tardíos del estrés. El hipotálamo estimula a la glándula hipófisis, la cual libera hormonas hacia la sangre y de ahí se distribuyen por todo el cuerpo. Se libera la hormona adrenocorticotrofina (ACTH), la cual estimula a la corteza suprarrenal para liberar corticoides y estos a su vez estimulan al hígado para liberar glucosa, elevan la tensión arterial, disminuyen los procesos inflamatorios y los linfocitos sanguíneos (células que se especializan en la defensa del cuerpo ante las infecciones); por lo cual, al estar sometido a un estrés prolongado aumentan las posibilidades de una infección. También se libera la hormona tirotrófina (TSH), la cual actúa sobre la glándula tiroides para aumentar la movilización de energía. Otras hormonas liberadas por la hipófisis son: la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo-estimulante (FSH), las cuales trabajan sobre las glándulas sexuales (testículos y

ovarios); por lo cual, el estrés puede alterar el ciclo sexual femenino y disminuir la cantidad de espermatozoides, comprometiendo así la fertilidad.

Se conoce que los radicales libres están involucrados en la respuesta al estrés y que alteran las actividades de las enzimas antioxidantes. Se han utilizado varios modelos experimentales para inducir estrés y evaluar los cambios en los sistemas antioxidantes. Se ha reportado que la Restricción de Movimiento es una forma fácil para inducir tanto estrés físico (estrés oxidativo) como estrés psicológico (Martínez-Sámano y cols., 2010).

Los cambios bioquímicos que se detonan como mecanismo de supervivencia a corto plazo, al estar sometido al estrés, tienen el efecto contrario cuando su presencia se prolonga. Por lo tanto, algunos efectos a largo plazo son un estado de salud deficiente, infecciones frecuentes y debilidad en general (Williams & Cooper, 2004).

#### **1.4 Clasificaciones**

Miller (2010), considera que existen diferentes tipos de estrés: estrés agudo, estrés agudo episódico y estrés crónico. Cada uno cuenta con sus propias características, síntomas, duración y se describirán a continuación.

El estrés agudo es la forma de estrés más común. Surge de las exigencias y presiones del pasado reciente y las exigencias y presiones anticipadas del futuro cercano. Exagerar con el estrés a corto plazo puede derivar en agonía psicológica, dolores de cabeza tensionales, malestar estomacal y otros síntomas. Afortunadamente, la mayoría de las personas reconocen los síntomas de estrés agudo, es una lista de lo que ha ido mal en sus vidas.

Dado que es a corto plazo, el estrés agudo no tiene tiempo suficiente para causar los daños importantes asociados con el estrés a largo plazo. Los síntomas más comunes son:

- Agonía Emocional: una combinación de enojo o irritabilidad, ansiedad y depresión, las tres emociones del estrés.
- Problemas Musculares: incluyen dolores de cabeza tensos, dolor de espalda, dolor en la mandíbula y las tensiones musculares que derivan en desgarramiento muscular y problemas en tendones y ligamentos.
- Problemas Estomacales e Intestinales: como acidez, flatulencia, diarrea, estreñimiento y síndrome de intestino irritable.
- Sobreexcitación Pasajera: que deriva en elevación de la presión sanguínea, ritmo cardíaco acelerado, transpiración de las palmas de las manos, palpitaciones, mareos, migrañas, manos o pies fríos, dificultad para respirar, y dolor en el pecho.

Por otra parte, están aquellas personas que tienen estrés agudo con frecuencia. Siempre están apuradas, pero siempre llegan tarde. Si algo puede salir mal, les sale mal. Asumen muchas responsabilidades, tienen demasiadas cosas entre manos y no pueden organizar la cantidad de exigencias autoimpuestas ni las presiones que reclaman su atención. Parecen estar perpetuamente en las garras del estrés agudo. Es común que las personas con reacciones de estrés agudo estén demasiado agitadas, tengan mal carácter, sean irritables, ansiosas y estén tensas. Suelen describirse como personas con "mucho energía nerviosa". Siempre apuradas, tienden a ser cortantes y a veces su irritabilidad se transmite como hostilidad. Las relaciones interpersonales se deterioran con rapidez cuando otros responden con hostilidad real. El trabajo se vuelve un lugar muy estresante para ellas.

Otra forma de estrés agudo episódico surge de la preocupación incesante. Los síntomas son los síntomas de una sobre agitación prolongada: dolores de cabeza tensos y persistentes, migrañas, hipertensión, dolor en el pecho y enfermedad cardíaca. Tratar el estrés agudo episódico requiere la intervención en varios niveles, que por lo general requiere ayuda profesional, la cual puede tomar varios meses.

Por otro lado, el estrés crónico destruye al cuerpo, la mente y la vida. Hace estragos mediante el desgaste a largo plazo. Surge cuando una persona nunca ve una salida a una situación deprimente. Es el estrés de las exigencias y presiones implacables durante

períodos aparentemente interminables. Sin esperanzas, la persona abandona la búsqueda de soluciones.

Algunos tipos de estrés crónico provienen de experiencias traumáticas de la niñez que se interiorizaron y se mantienen dolorosas y presentes constantemente. Algunas experiencias afectan profundamente la personalidad. Se genera una visión del mundo, o un sistema de creencias, que provoca un estrés interminable para la persona (por ejemplo, el mundo es un lugar amenazante, las personas descubrirán que finge lo que no es, debe ser perfecto todo el tiempo). Cuando la personalidad o las convicciones y creencias profundamente arraigadas deben reformularse, la recuperación exige el autoexamen activo, a menudo con ayuda de un profesional.

El peor aspecto del estrés crónico es que las personas se acostumbran a él, se olvidan que está allí. Las personas toman conciencia de inmediato del estrés agudo porque es nuevo; ignoran al estrés crónico porque es algo viejo, familiar y a veces hasta casi resulta cómodo.

El estrés crónico mata a través del suicidio, la violencia, el ataque al corazón, la apoplejía e incluso el cáncer. Las personas se desgastan hasta llegar a una crisis nerviosa final y fatal. Debido a que los recursos físicos y mentales se ven consumidos por el desgaste a largo plazo, los síntomas de estrés crónico son difíciles de tratar y pueden requerir tratamiento médico y de conducta y manejo del estrés.

López-Ibor & Valdés (2002), distinguen dos tipos de trastornos provocados por el estrés, los cuáles vienen incluidos dentro de los Trastornos de Ansiedad: el Trastorno por estrés agudo y el Trastorno por estrés postraumático.

El trastorno por estrés agudo se caracteriza por la aparición de ansiedad, síntomas disociativos que aparecen durante el mes posterior a la exposición al acontecimiento traumático. Las alteraciones deben durar por lo menos dos días y no más de cuatro semanas posteriores a la aparición de la situación estresante. Los sujetos con este trastorno pueden mostrar una disminución de la reactividad emocional, dificultad para concentrarse, amnesia disociativa, despersonalización, puede haber síntomas de

desesperación y desesperanza. Las personas con este trastorno presentan mayor riesgo de padecer el trastorno por estrés postraumático. Se ha encontrado que a consecuencia del acontecimiento traumático pueden existir varias enfermedades médicas.

La característica esencial del trastorno por estrés postraumático es la aparición de síntomas característicos que sigue a la exposición a un acontecimiento estresante y extremadamente traumático. Los estímulos asociados al acontecimiento traumático acaban siendo persistentemente evitados. El sujeto con este trastorno padece constantemente síntomas de ansiedad o aumento de la activación que no existían antes del trauma. Se ha observado que este trastorno puede asociarse a un aumento en el porcentaje de trastornos somáticos y de enfermedades médicas.

Para diferenciar el inicio y la duración de los síntomas del trastorno por estrés postraumático, López-Ibor & Valdés (2002) proponen tres clasificaciones: agudo (la duración de los síntomas es menor a tres meses), crónico (la duración de los síntomas es igual o mayor a tres meses) y de inicio moderado (donde entre el acontecimiento traumático y el inicio de los síntomas han pasado mínimo seis meses).

Otra clasificación del estrés es la que lo divide en dos tipos: el estrés bueno (eustrés) y el estrés malo (distrés). El primero, sirve para mantener el estado de alerta y las condiciones para enfrentar desafíos, este tipo de estrés no causa trastornos en el organismo. En el segundo, la intensidad y perdurabilidad generan alteraciones físicas y psicológicas (López, 2001).

Cuando el estrés se presenta en forma crónica, prolongado en el tiempo, no necesariamente intenso, pero exigiendo adaptación permanente, se llega a sobrepasar el umbral de resistencia del sujeto para provocar las llamadas enfermedades de adaptación. Es decir, que cuando el organismo se encuentra sobreestimulado, agotando las normas fisiológicas del individuo, el estrés se convierte en distrés.

El estrés crónico puede darse ya sea por una exposición prolongada y continua a factores estresantes externos o por condiciones crónicas o prolongadas de la respuesta al estrés (como en sujetos deprimidos y en el estrés postraumático). Aquí, el sujeto se ve

expuesto prolongadamente a las llamadas hormonas del estrés (catecolaminas, adrenalina y noradrenalina, liberadas por el sistema nervioso simpático; y los glucocorticoides). Las reacciones continuas o crónicas las acciones se desencadenan por el mecanismo endócrino o hipofisario.

McKinney (1988) considera que el modelo de estrés crónico para animales puede servir para comprender mejor las causas neuro-hormonales del estrés crónico y de las reacciones del cuerpo, lo cual permitirá a los científicos crear tratamientos más efectivos destinados a los humanos.

El estrés contribuye de forma significativa en la etiología de la depresión, ansiedad, entre otros (Bale, 2005). Cuando la vida cotidiana está llena de eventos estresantes se pueden precipitar eventos depresivos en humanos (Gilmer & McKinney, 2003), gran cantidad de estudios han utilizado estrés para inducir cambios que se asemejen a los síntomas de la depresión (Willner, 2005). La sensibilidad a eventos estresantes es importante en el desarrollo del trastorno del estado de ánimo (Harro & Oreland, 2001).

Los estímulos estresantes son las situaciones desencadenantes del estrés y pueden ser cualquier estímulo, externo o interno (tanto físico, químico, acústico o somático como sociocultural) que, de manera directa o indirecta, propicie la desestabilización en el equilibrio dinámico del organismo.

Éstos pueden ser de dos tipos, físicos o psicológicos. Algunos ejemplos de estrés físico son: exposición al frío, ayuno, hipoglicemia, hemorragia, hipoxia, estímulos cardiovasculares; algunos ejemplos de estrés psicológico son: inmovilización, restricción de movimiento (RM), subordinación social, miedo condicionado, nado forzado, ruido, exposición a ambientes novedosos o espacios abiertos y áreas iluminadas, entre otros (García, 2006).

Moberg & Mench (2001), consideran que existe una fuerte relación entre nutrición y los sistemas inmunológico y endócrino. Los nutrientes, los cuáles viajan a través de la sangre, al estar ante una situación estresora se dirigen hacia los órganos que lo

requieran más. De igual forma, creen que la capacidad del sistema inmunológico ante las enfermedades varía dependiendo del estado nutricional y el sistema endócrino.

Se conoce que la *Spirulina maxima* es un suplemento alimenticio que tiene propiedades antioxidantes que podrían atenuar las alteraciones inducidas por el estrés, por lo cual, se utilizó al 5% en la dieta de los sujetos experimentales.



## Capítulo 2

### *Spirulina maxima*

Para Ramírez-Moreno & Olvera-Ramírez (2006), la *Spirulina* es una cianobacteria filamentosa no diferenciada, habitante de lagos alcalinos, que se cultiva para consumo humano debido a su contenido nutricional.

Según Belay & Gershwin (2007), la *Spirulina* es una biomasa seca de la cianobacteria *Arthrospira*. En su uso taxonómico, la *Spirulina* es un nombre utilizado para describir dos especies de cianobacterias principalmente, *A. platensis* y *A. maxima*.

La *Spirulina maxima* es una cianobacteria clasificada taxonómicamente en la clase Cyanophyceae, orden nostocales, familia oscillatoriaceae, género *Spirulina*, especie *maxima* o Geitleri, la cual actualmente es denominada *Arthrospira maxima*. La célula mide de 5 a 10 µm de diámetro, es de forma filamentosa y helicoidal con 5 a 6 torsiones, se caracteriza por un diámetro de hélice de 50 a 60 µm, y por un espesor de 80 µm y mide de 200 a 300 µm de longitud, no ramificada (Chamorro y cols., 2002).

En México, el consumo de esta cianobacteria se remonta a tiempos prehispánicos. Los aztecas la conocían como tecuitlatl y la obtenían del lago de Texcoco. Los nativos de Chad, en África también la consumen y es conocida como dihé (Kay, 1991).

Esta cianobacteria es fuente rica en proteínas, aminoácidos, vitaminas, minerales y otros nutrientes, por lo que algunos de sus principales usos son: como suplemento alimenticio (en polvo, encapsulado, en tabletas), como sustituto de harina (en diferentes sabores), en pastas, botanas, salsas, barras de granola, golosinas o bebidas instantáneas de frutas o vegetales.

La *Spirulina* contiene gran variedad de macronutrientes y micronutrientes (ver Tabla 2), algunos de los cuales no pueden ser sintetizados por el organismo humano, así como en algunas de sus propiedades, tales como incrementar los niveles de energía, reducir el

estrés premenstrual, incrementar el rendimiento de atletas, mejorar el apetito y ofrecer protección antioxidante (Kay, 1991).

Las propiedades antioxidantes de la *Spirulina* se deben a que contiene el ácido graso esencial gamma-linolénico (GLA),  $\beta$ -caroteno y ficocianina; las cuales tienen la capacidad de atrapar a los radicales libres, además, la ficocianina inhibe la lipoperoxidación (Gershwin & Belay, 2008).

En los últimos años, se han atribuido diversos efectos positivos a la *Spirulina maxima*, en el tratamiento de algunos tipos de alergias, anemia, cáncer, enfermedades virales y cardiovasculares. Muchas de sus propiedades son consecuencia de la presencia de pigmentos como las ficobiliproteínas y los carotenoides, así como de otros compuestos como polisacáridos, ácidos grasos (destacando el ácido gamma linolénico), proteínas, vitaminas y minerales. Las propiedades y aplicaciones de este organismo hacen de él un alimento "promotor de la salud" (ver Tabla 2).

Se realizaron varios estudios para valorar los efectos que la *Spirulina* tiene sobre algunos roedores y el humano. Algunos efectos positivos encontrados son: la inmunoregulación, efectos antioxidantes, anticancerígenos, antivirales, antitóxicos y contra la hiperlipidemia y la hiperglucemia. Se ha comprobado a nivel experimental, *in vivo* e *in vitro*, su efectividad en el tratamiento de algunos tipos de alergias, anemia y leucemia, en otros tipos de cáncer, en reducción de hepatotoxicidad, en enfermedades virales y cardiovasculares, diabetes, obesidad, inmunodeficiencia y procesos inflamatorios, entre otros. (Chamorro y cols., 2002; Gershwin & Belay, 2008), (ver Tabla 3).

**Tabla 2. Valor Nutricional de las Microalgas (Tomado de Kay, 1991)**

<b>Valor Nutricional de Microalgas Producidas Comercialmente</b>			
	<i>Aph. Flosaquae</i>	<i>Chlorella</i>	<i>Spirulina</i>
Humedad	6%	5%	5%
Proteína	63%	58%	65%
Lípidos Totales	3%	9%	5%
Ácidos Grasos	n/a	n/a	n/a
Carbohidratos	27%	23%	18%
Cenizas	7%	3%	7%
Calcio	140.0 mg	22.0 mg	100.0 mg
Fósforo	51.0 mg	90.0 mg	90.0 mg
Hierro	6.4 mg	13.0 mg	15.0 mg
Sodio	38.0 mg	n/a	60.0 mg
Cloro	46.0 mg	n/a	44.0 mg
Cromo	40.0 mg	n/a	28.0 µg
Cobrer	60.0 µg	10.0 µg	120.0 µg
Magnesio	16.0 mg	32.0 mg	40.0 mg
Manganeso	0.3 mg	n/a	0.5 mg
Cinc	0.3 mg	7.0 mg	0.3 mg
Potasio	100.0 mg	90.0 mg	120.0 mg
Otros	n/a	n/a	n/a
Vitaminas			
Ácido Ascórbico	5.0 mg	1.0 mg	0.5 mg
Caroteno	2,000.0 RE	550 RE	2,300.0 RE
Biotina	3.6 µg	19 µg	0.5 µg
Cobalamina	8.0 µg	1.3 µg	3.2 µg
Colina	2.6 mg	n/a	n/a
Ácido Fólico	1.0 µg	2.7 µg	1.0 µg
Piridoxina	67.0 µg	140.0 µg	80.0 µg
ÁcidoPantoténico	130.0 µg	130.0 µg	10.0 µg
Niacina	0.65 mg	2.38 mg	1.46 mg
Tiamina	0.03 mg	0.17 mg	0.31 mg
Inositol	n/a	13.2 mg	6.4 mg
Vitamina E	1.2 UI	0.1 UI	1.0 UI
Pigmentos y Otros Compuestos			
Carotenoides	n/a	n/a	37.0 mg
Ficocianina	n/a	n/a	1,500.0 mg
Clorofila	300 mg	200 µg.	115.0 mg
Ácido Gamma Linolénico	n/a	n/a	135.0 mg
Glicolípidos	n/a	n/a	200.0 mg
Sulfolípidos	n/a	n/a	4-10.0 mg
Ácidos Nucleicos	n/a	30%	4.5%
Las cantidades están dadas por 10 g de peso seco.			
Los datos para <i>Aph. flos-aquae</i> son de Cell Tech. Los de <i>Chlorella sp.</i> Son de <i>Sun Chlorella</i> . Los de <i>Spirulina sp.</i> son de Earthrise Farms. SOSA n/a = no analizado; UI = Unidad Internacional; RE = Equivalentes de retinol.			

**Tabla 3. Efectos farmacológicos de la *Spirulina*. (Chamorro y cols., 2002).**

EFEECTO	MODELO	RESUMEN DE RESULTADOS
Antialérgico	Rata	La inoculación intraperitoneal inhibió varios tipos de reacciones alérgicas. In vitro previno la producción de TNF-alfa por macrófagos peritoneales. Resultados similares se obtuvieron con la proveniente de otra fuente.
Antianémico	Rata	Sola o en combinación con gluten de trigo, aumentó el contenido de hierro y hemoglobina durante la primera semana de la gestación y en la lactancia.
Anticancerígeno	Células Ratón	Siete administraciones intravenosas de 100 µg de Ca-Sp cada una, obtenido de la cianobacteria, causaron marcada disminución de tumor pulmonar colonizado con células B16-B6. Redujo el citocromo P450 hepático, inducción de glutatión S-transferasa hepática; sin embargo, la actividad de la enzima extrahepática no mostró cambios. Aumentó el tiempo de supervivencia de ratones BALB/c inoculados con el linfosarcoma L517BY.
Anticoagulante	Cofactor heparina. Fibroblastos	Un polisacárido aislado de la cianobacteria aumentó en más de mil veces la actividad antitrombina del cofactor II de la heparina. El mismo polisacárido aumentó la producción de activador del plasminógeno, en una línea celular de fibroblastos humanos.
Antigenotóxico	Células	Extractos acuosos y orgánicos inhibieron la frecuencia de micronúcleos en células meióticas de <i>Tradescantia</i> , inducida por la hidrazida del ácido maleico.
Antihepatotóxico	Rata	La <i>Spirulina</i> , el extracto oleoso y la fracción de la cianobacteria exenta de grasa, previnieron el hígado graso inducido por el tetracloruro de carbono. La ficocianina proveniente del alga protegió contra la hepatotoxicidad producida por el tetracloruro de carbono y la pulegona.
Antiinflamatorio	Ratón Ratón y rata Ratón Rata	La ficocianina obtenida de <i>Spirulina</i> redujo la inflamación producida por peróxido. La ficocianina obtenida de la cianobacteria mostró actividad antiinflamatoria en cinco modelos experimentales. Extractos de ficocianina, obtenidos de <i>Spirulina</i> inhibieron el edema en oído y las concentraciones de LTB <sub>4</sub> inducidos por ácido araquidónico. La ficocianina obtenida de <i>Spirulina</i> redujo la actividad de mieloperoxidasa e inhibió la infiltración celular inflamatoria y el daño en colon.
Antiparasitario	Ratón	En ratones inoculados con <i>Plasmodium chabaudi</i> no se observó efectos en la parasitemia, pero tampoco desarrollaron recrudescencia.
Antitóxico	Rata	Redujo la toxicidad del plomo sobre testículos, peso corporal y diámetro tubular.
Antiviral	Células humanas Virus	Un extracto acuoso inhibió en 50% la producción de HIV-I en líneas de células humanas, células mononucleares y células de Langerhans. El Ca-Spirulan inhibió la replicación de HIV-I y HSV-I en líneas de células humanas. El remplazo del ion Ca por iones de Na y K en la molécula de Ca-SP, conservó su actividad antiviral.
Cardiovascular	Anillos aórticos	Administrada durante dos semanas al 5% en la dieta, mostró efectos sobre las respuestas vasomotoras dependientes del endotelio en anillos de aorta. Administrada durante 6 semanas al 5% en la dieta, previno los efectos vasomotores de una dieta rica en fructosa (60%) en anillos de aorta de rata. El extracto alcohólico aumentó la síntesis de NO por el endotelio y de un prostanoides vasoconstrictor por células no endoteliales.
Hipoglicemiante	Rata	El extracto metanólico causó disminución del área bajo la curva de glucosa en animales diabéticos, sugiriendo efecto hipoglicemiante. Sin embargo, el extracto diclorometanólico produjo efecto hiperglicemiante en ratas normales y diabéticas, mostrando la existencia de principios antagónicos en el alga.
Hipolipidémico	Rata	Disminución del colesterol hepático, incrementado por el tetracloruro de carbono.
Inmunoestimulante	Ratón Pollo Gatos	La incorporación a la dieta de ratones normales mejoró las respuestas de anticuerpos a eritrocitos de carnero. La administración simultánea oral con un antígeno, incrementó la respuesta de IgA en intestino. La administración de un extracto a cultivos de macrófagos peritoneales de pollo aumentó su capacidad fagocítica. La incorporación a la dieta de pollos mejoró su respuesta secundaria de anticuerpos antieritrocitos de carnero, la respuesta mitogénica a PHA, la actividad fagocítica de macrófagos y la actividad NK. La adición de extracto a cultivos de macrófagos de gato aumentó su capacidad fagocítica.

Se sabe que *la Spirulina maxima* es un suplemento alimenticio con propiedades antioxidantes, por lo cual se utilizó para mejorar los sistemas antioxidantes de defensa y mejorar el metabolismo de lípidos ante la producción de Especies de Oxígeno Reactivas producto de un estrés agudo inducido por la Restricción de Movimiento.

## Capítulo 3

### Sistemas Antioxidantes de Defensa

En la actualidad, se sabe que el metabolismo celular produce constantemente Especies de Oxígeno Reactivas (EOR), las cuales son tóxicas para el organismo. Por lo cual, éste desarrolló estrategias de defensa, llamadas Sistemas Antioxidantes. Ambos, oxidantes y antioxidantes, forman parte importante del proceso salud-enfermedad en los seres vivos. (Díaz-Zagoya & Juárez-Oropeza, 2007).

Un antioxidante es cualquier sustancia que al estar en concentraciones más bajas que un sustrato oxidable, retrasa significativamente o inhibe la oxidación del sustrato. Los sistemas de defensa antioxidante participan como un mecanismo protector contra los efectos de los radicales libres en función del grado de agresividad de éstos.

Para Díaz-Zagoya & Juárez-Oropeza (2007), los sistemas antioxidantes se clasifican en:

- Endógenos: son sintetizados por el organismo y se subdividen en:
  - Enzimáticos:
    - Superóxido Dismutasa (SOD): existen 3 tipos en el ser humano: SOD-Zn/Cu (está en el citoplasma), SOD-Mn (se encuentra en la matriz mitocondrial) y SOD-extracelular (está en el líquido extracelular y en el plasma sanguíneo).
    - Catalasa (CAT): cataliza la conversión de dos moléculas de  $H_2O_2$  en dos moléculas de agua y una de  $O_2$ . Previene la formación de radicales hidroxilos a través de un mecanismo tipo Fenton.
    - Peroxidasa de Glutación (GSH-Px)
  - No Enzimáticos:
    - Proteínas intracelulares.
    - Proteínas plasmáticas transportadoras de iones metálicos o de complejos organometálicos.
    - Glutación:

- Glutación Reducido (GSH): su función antioxidante es indirecta ya que sirve como coenzima de oxidorreducción para la GSH-Px y con NADPH puede reducir radicales  $H_2O_2$  y lipoperoxilos.
- Glutación Oxidado (GSSG): se reduce nuevamente a GSH mediante la glutación reductasa.
- Exógenos: se encuentran en los alimentos y disminuyen de forma importante los efectos adversos de las EOR. Algunos son:
  - Carotenoides (Provitamina A): zanahoria, jitomate, frutas cítricas, espinacas, brócoli, maíz, mango, etc.
  - Vitamina E: aceites vegetales, margarina, mayonesa, nueces, algunas hortalizas de hoja verde, etc.
  - Vitamina C: naranja, fresa, kiwi, brócoli, coliflor, melón, etc.
  - Flavonoides: verduras, cereales, leguminosas, frutas, vino, cerveza, etc.
  - Selenio
  - Cobre
  - Zinc
  - Manganeso

Como el sistema de defensa antioxidante no es eficiente del todo, es probable que el incremento en la formación de radicales libres ocasione daño en el cuerpo. Los radicales libres pueden alterar sistemas biológicos y dañar una gran cantidad de moléculas, a este estado se le llama Estrés Oxidativo. El Estrés Oxidativo se presenta cuando el balance entre la generación de radicales libres y la defensa antioxidante resulta desfavorable para la célula (Díaz-Zagoya & Juárez-Oropeza, 2007).

Cuando se pierde el balance entre los agentes oxidantes y antioxidantes, a favor de los oxidantes se le conoce como Estrés Oxidativo. (Storz & Zheng, 2000).

Debido a que los radicales libres pueden inducir daño en casi todas las biomoléculas, se les relaciona con muchas enfermedades, como: hepatitis, cirrosis, cáncer, aterosclerosis, enfermedades neurológicas degenerativas, asma, diabetes mellitus,

lupus, entre otras. Por lo cual, los antioxidantes se usan en la prevención primaria para optimizar el estado de bienestar y salud de las personas así como en la prevención secundaria de múltiples enfermedades.



## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

### **Justificación**

La Restricción de Movimiento (RM) es un método para inducir estrés físico y psicológico que permite la valoración de posibles tratamientos para disminuir las consecuencias fisiológicas de estar sometido al estrés. Por lo anterior, se utilizó la RM para valorar los efectos de la *Spirulina maxima* sobre los cambios bioquímicos indicadores del estrés (psicológico y oxidativo) que acompañan al estrés agudo.

Ya que estamos sometidos constantemente a situaciones estresantes, las cuales no siempre son fácilmente controlables, se propone el uso de la *Spirulina maxima* como un suplemento alimenticio el cual podría ayudar a mejorar la calidad de vida de las personas, atenuando las respuestas fisiológicas negativas que pueden provocar una enfermedad. De igual forma, es importante conocer los cambios bioquímicos que se producen al estar sometido a una situación estresante.

### **Pregunta de Investigación**

¿Influye la ingesta de *Spirulina maxima* en la respuesta fisiológica del estrés agudo en ratas?

### **Objetivo General**

El objetivo de este estudio es conocer si la *Spirulina maxima* influye en las respuestas fisiológicas ante situaciones estresoras.

### **Objetivos Particulares**

1. Someter a los sujetos experimentales a un estrés agudo para interpretar los efectos de la *Spirulina maxima* en las respuestas fisiológicas inducidas.
2. Evaluar las respuestas fisiológicas producto de un estrés agudo provocado por la Restricción de Movimiento.

## **METODOLOGÍA**

### **Hipótesis**

Las ratas alimentadas con *Spirulina maxima* tendrán mejores defensas antioxidantes ante el estrés agudo, en comparación con las ratas alimentadas sin *Spirulina maxima* al 5%.

### **Definición de Variables**

**Variable Dependiente:** cambio en la respuesta fisiológica de las ratas (Glucosa, Colesterol Total, Triacilgliceroles, Ácidos Grasos Libres, Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico, Glutación Reducido, Superóxido Dismutasa, Catalasa y Corticosterona).

**Variable Independiente<sub>1</sub>:** instrumentación de un ambiente estresor: restricción de movimiento (RM).

**Variable Independiente<sub>2</sub>:** ingesta de *Spirulina maxima* al 5%.

### **Diseño Experimental**

Se utilizó un diseño post-prueba.

**Tabla 4. Diseño Experimental**

<b>Grupo</b>	<b>Tratamiento 1</b>	<b>Tratamiento 2</b>	<b>Pruebas</b>
G <sub>1</sub>	–	–	O <sub>1</sub>
G <sub>2</sub>	–	X <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
G <sub>3</sub>	X <sub>1</sub>	–	O <sub>3</sub>
G <sub>4</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	O <sub>4</sub>

Donde:

G<sub>1</sub>: sin RM y dieta comercial para roedores. (C)

G<sub>2</sub>: sin RM y dieta comercial para roedores adicionada con *Spirulina maxima* al 5%. (Sm)

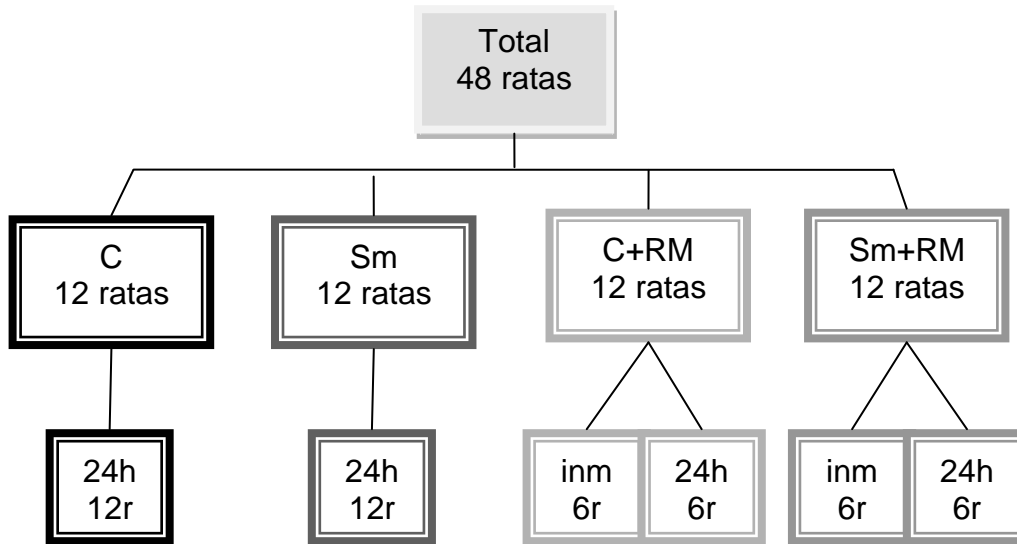
G<sub>3</sub>: se sometió a RM y dieta comercial para roedores. (C+RM)

G<sub>4</sub>: se sometió a RM y dieta comercial para roedores adicionada con *Spirulina maxima* al 5%. (Sm+RM)

X<sub>1</sub>: atmósfera estresora : restricción de movimiento (RM).

X<sub>2</sub>: dieta comercial para roedores adicionada con *Spirulina maxima* al 5%. (Sm)

O<sub>1-4</sub>: en plasma e hígado se determinaron: Colesterol Total (CT), Triacilgliceroles (TAG), Ácidos Grasos Libres, Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), Glutati6n Reducido (GSH), Super6xido Dismutasa (SOD) y Catalasa (CAT); en plasma se determin6: Corticosterona y Glucosa.



**Figura 1. Diseño experimental utilizado**

### **Muestra**

La muestra fue de 48 ratas macho de la cepa Wistar de  $217 \pm 20$  g de peso corporal y aproximadamente 2 meses de edad al inicio del tratamiento, se obtuvieron del Bioterio de la Facultad de Medicina, UNAM. Se asignaron en cuatro grupos de 12 ratas cada uno (3 ratas/jaula). La dieta de las ratas varió dependiendo del grupo al que pertenecía, los grupos 1 y 3 sólo fueron alimentados con una dieta comercial para roedores (20g/rata/día); y los grupos 2 y 4 con una dieta comercial para roedores adicionadas con *Spirulina maxima* al 5% (20g/rata/día) y el agua fue *ad libitum* para todos los grupos.

La temperatura fue controlada a 20°C, la humedad fue ambiental y las ratas se sometieron a periodos de luz-obscuridad de 12h cada uno para no alterar su ritmo circadiano.

## **Consideraciones Éticas**

El manejo de los animales de experimentación se realizó de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO, 1999).

## **Materiales y Equipo**

Algunos instrumentos utilizados fueron:

- Balanza Analítica: marca Sartorius, modelo Basic (Alemania).
- Lector de microplacas: marca Awareness Technology Inc.
- Espectrofotómetro: UV-visible marca Thermo, modelo Genesys 10uv.
- Centrífuga refrigerada: marca International Equipment Company (IEC), modelo Centra MP4R.
- Homogenizador: Polytron Aggregate, modelo PT 1200, marca Kinematica, (Suiza).
- Micropipetas y Multidispensador: marca Gilson y Eppendorf, respectivamente.
- Jaulas.
- Bebederos.
- Comederos.
- Cuarto con temperatura y humedad controladas.
- Material típico de laboratorio.
- Jaulas de restricción de movimiento (cilindros de acrílico de 18cm de largo x 7cm de diámetro).

Los reactivos utilizados se obtuvieron en:

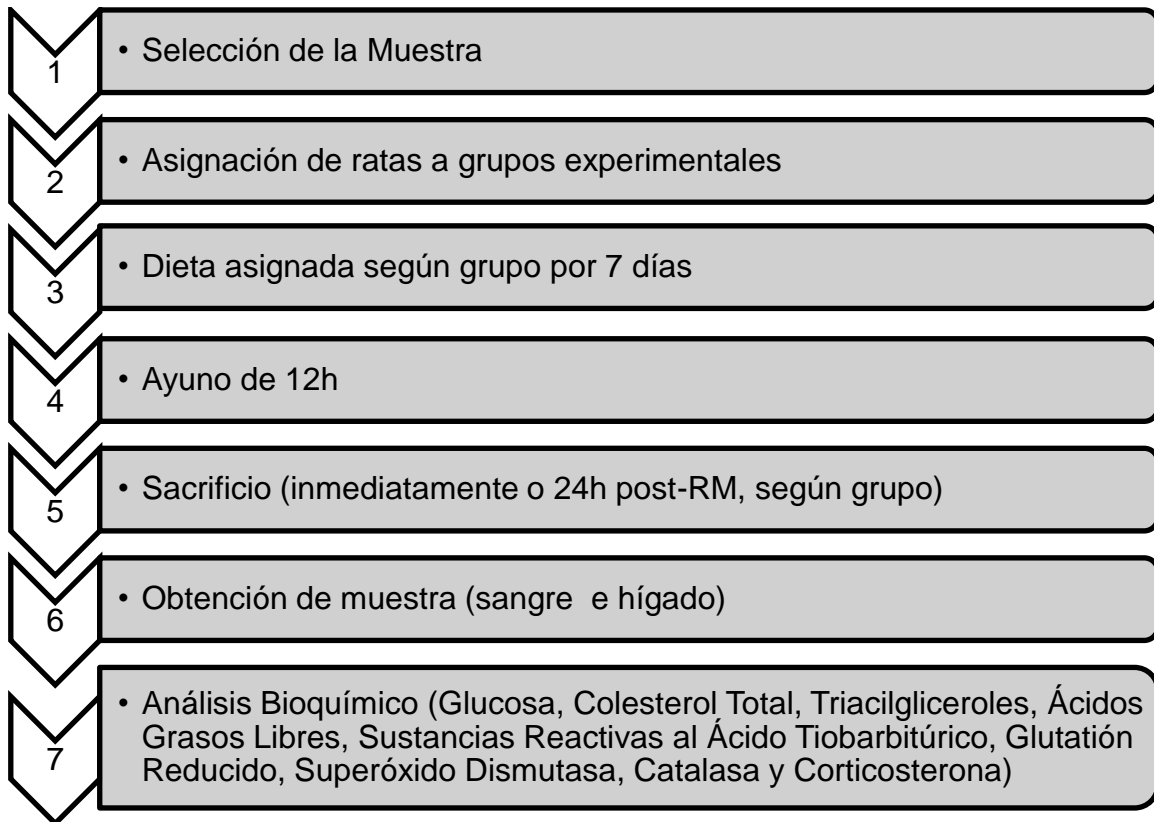
- *Spirulina maxima* en polvo fue adquirida de “Alimentos Esenciales para la Humanidad AEH, S.A. de C.V.”
- Los reactivos fueron obtenidos de Sigma - Aldrich Chemical Co. (San Luis, MO) y los solventes de Merck, México S.A. de CV. (México, D.F.)

## **Procedimiento**

Las ratas fueron asignadas en cuatro grupos, 12 ratas por grupo. El primer grupo no tuvo RM y tuvo una dieta comercial para roedores; el segundo grupo no fue sometido a la RM y se alimentó con una dieta comercial para roedores conteniendo *Spirulina maxima* al 5%; el tercer grupo estuvo sometido a la RM y tuvo una dieta comercial para roedores; el cuarto grupo estuvo sometido a la RM y tuvo una dieta comercial para roedores conteniendo *Spirulina maxima* al 5%.

Cada grupo fue alimentado por la dieta especificada (según su grupo) por 7 días. Al octavo día, previo ayuno de 12h, los grupos 3 y 4 fueron sometidos a la RM durante 2h. Al finalizar, estos grupos se dividieron en 2 subgrupos de 6 ratas cada uno, mismos que se sacrificaron: inmediatamente después y a las 24h posteriores a la RM, respectivamente, para realizar las pruebas pertinentes y realizar una comparación entre los grupos y subgrupos (ver Figura 2).

El tiempo experimental mínimo para observar el efecto protector de la *Spirulina maxima* es de 5 días, por lo que la etapa de aclimatación fue de 7 días (Torres-Durán y cols., 1998).



**Figura 2. Procedimiento.** Se ilustra las etapas del procedimiento para la obtención y análisis de la muestra. 1. La selección de los animales fue con base en el sexo (machos) y peso ( $217 \pm 20$  g de peso corporal). 2. La asignación fue aleatoria. 3. La dieta asignada fue proporcionada en cantidad limitada y en un mismo horario. 4. Se sometieron a ayuno de 12 h para valorar adecuadamente los lípidos. 5. Posterior a la RM y con ayuno de 12 h, los animales se sacrificaron en los tiempos mencionados. 6. Se obtuvo sangre e hígado, el plasma y tejido hepático se congelaron a  $-74^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizaron los análisis bioquímicos. 7. Los análisis bioquímicos se realizaron inmediatamente o en la muestra descongelada, con base en la metodología utilizada. 8. Se valoraron indicadores del metabolismo de carbohidratos, lípidos y estrés oxidativo.

Para la RM cada rata se metió a una jaula de RM (18cm de largo x 7cm de diámetro) y se mantuvo dentro de ésta durante 2h (ver Figuras 3 y 4).





**Figura 3. Dispositivo para RM**



**Figura 4. Grupo durante la RM**

En las Figuras 3 y 4 se observa el dispositivo utilizado para inducir la RM. Los sujetos experimentales estuvieron en la jaula por 2h. Posterior a la RM fueron sacrificadas inmediatamente o 24h post-RM.

Se evaluaron 2 tiempos experimentales para conocer la secuencia de eventos y su duración al estar sometido a un estrés agudo.

### **Obtención del Material Biológico**

Las ratas se sometieron a un ayuno de 12h mínimo. Cada una se pesó y se sacrificó inmediatamente o a las 24h posteriores a la RM, según su grupo, previa anestesia con éter. La sangre se recolectó en tubos Vacutainer con heparina, los cuales fueron centrifugados a 4,000 RPM durante 15 minutos para obtener el plasma de cada uno. El hígado fue recolectado en papel aluminio y se pesó; posteriormente, se obtuvieron fragmentos de 1g los cuales fueron utilizados para la determinación de lípidos, enzimas antioxidantes y proteínas; el fragmento de hígado fue homogeneizado con un homogeneizador polytrón en un buffer de fosfatos (0.02M, pH=7.2, en una proporción 4:1, v:p). Plasma e hígado se mantuvieron en congelación a -74°C hasta que fueron analizados.

### **Análisis Estadístico**

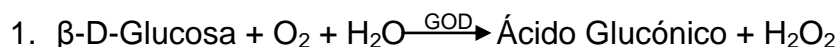
Los datos obtenidos fueron analizados mediante el programa GraphPad Prism versión 4 para Windows. Se utilizó la prueba de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba post-hoc Bonferroni, considerando significativo  $p \leq 0.05$ .

### **Pruebas**

#### **Método para Determinar Carbohidratos**

#### ***Metodología para Determinar Glucosa***

Se utilizó el kit enzimático - colorimétrico para determinar Glucosa de Spinreact (México, D.F.), siguiendo las instrucciones sugeridas por el proveedor. Las reacciones enzimáticas del kit son las que se indican abajo.





En donde: GOD: glucosa oxidasa y POD: peroxidasa. Al final de la reacción, la absorbancia del cromóforo (Quinona) se determinó 505nm.

## **Método para Determinar Lípidos**

### ***Metodología para Determinar CT***

Se utilizó el kit enzimático - colorimétrico para determinar Colesterol Total de JAS Diagnostics Inc. (México, D.F.). Las determinaciones de hicieron de acuerdo con las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Las reacciones del kit son las que se muestran abajo.

1. Ésteres de Colesterol  $\xrightarrow{\text{C. Esterasa}}$  Colesterol + Ácidos Grasos
2. Colesterol + O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{C. Oxidasa}}$  Colesterol-4-en-3-one + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
3. 2H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HBA + 4AAP  $\xrightarrow{\text{Peroxidasa}}$  Quinoneimina + 4H<sub>2</sub>O

En donde: C. Esterasa: colesterol esterasa; C. oxidasa: colesterol oxidasa y Peroxidasa: peroxidasa. Al final de la reacción, la absorbancia del cromóforo (Quinoneimina) se determinó a 520nm.

### ***Metodología para Determinar TAG***

Se utilizó el kit enzimático-colorimétrico para determinar Triacilgliceroles de Spinreact (México, D.F.), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Las reacciones enzimáticas del kit son las que se muestran a continuación.

1. Triacilgliceroles + 3H<sub>2</sub>O + LP  $\rightarrow$  Glicerol + 3R-COOH

2. Glicerol + ATP + GK  $\longrightarrow$  Glicerol-3-P + ADP
3. Glicerol-3-P + O<sub>2</sub> + GFO<sub>x</sub>  $\longrightarrow$  Dihidroxiacetona-P + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-aminofen + 4-clorofenol + PO<sub>x</sub>  $\longrightarrow$  Quinona + 2H<sub>2</sub>O + HCl

En donde: LP: lipasa pancreática; GK: glicerol cinasa; GFO<sub>x</sub>: glicerol-3-fosfato oxidasa; PO<sub>x</sub>: peroxidasa. Al final de la reacción, la absorbancia del cromóforo (Quinona) se determinó a 510nm.

### ***Metodología para Determinar Ácidos Grasos Libres***

Se utilizó el kit enzimático - colorimétrico “Free Fatty Acids, Half Micro Test” de Roche (México, D.F.), siguiendo las instrucciones proporcionadas por el proveedor. Las reacciones enzimáticas del kit son las siguientes.

1. Ac. Grasos L. + CoA + ATP  $\xrightarrow{\text{Acil CS}}$  acil-CoA + AM P + pirofosfato
2. Acil-CoA + O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{\text{ACOD}}$  enoil-CoA + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 4-AA + TBHB  $\xrightarrow{\text{POD}}$  colorante rojo + 2 H<sub>2</sub>O + HBr

En donde: AcilCS: acil-CoA sintetasa; ACOD: acil-CoA deshidrogenasa; POD: peroxidasa. Al final de la reacción, la absorbancia del cromóforo (colorante rojo) se determinó a 546nm.

### **Método para Determinar Estrés Oxidativo**

#### ***Metodología para Determinar SOD***

Se realizó por el método de Kono (1978), que se basa en la reducción de NBT (por sus siglas en inglés, nitroblue tetrazolium) formando un compuesto con color. Se colocó en un tubo de ensayo 25µl de la muestra, 25µl de Tritón-X100 al 0.6%, 25µl de EDTA 0.1M,

325µl de Carbonato de Sodio 50mM y 62,5µl de NBT, se incubó a 37°C por 10 minutos, posteriormente se agregó 25µl de Hidrocloruro de Hidroxilamina 20mM y por último se midió el cambio de absorbancia cada minuto por 5 minutos en espectrofotómetro, para determinar la actividad enzimática a 560nm. Cada muestra por duplicado.

### ***Metodología para Determinar CAT***

Se determinó por el método de Aebi (1984), el cual se basa en la desaparición del Peróxido de Hidrógeno convertido en  $H_2O_2$  y  $O_2$ ; para tal fin, se mezclaron 10µl de la muestra, 30µl de Tritón al 1% (órganos), 635µl de  $Na_2HPO_4$  0.2M con pH 7.2 y 335µl de Peróxido de Hidrógeno  $H_2O_2$  0.03M recién preparado. Se midió el cambio de absorbancia cada minuto por 5 minutos a 240nm. Cada muestra por duplicado.

### ***Metodología para Determinar GSH***

Se determinó por el método de Owens & Belcher (1965). Previa curva estándar se tomó 20µl de la muestra, 610µl de  $Na_2HPO_4$  0.03M con pH de 7.2, 50µl de DTNB disuelto en 1% de Citrato de Sodio; se deja reposar 5 min y posteriormente se centrifuga a 10,000 RPM por 5 minutos, se toma el sobrenadante y se lee la absorbancia a 412nm. En órganos, previo lo anterior se toma 100µl del homogenado y se le agrega 10µl de ácido tricloroacético (TCA), se centrifuga a 10,000 RPM y se toma el sobrenadante para lo antes mencionado. Cada muestra por duplicado.

### ***Metodología para Determinar TBARS***

Se utiliza el método de Ohkawa y cols. (1979). Se evaluó el nivel de productos finales de la lipoperoxidación por la técnica de las Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico (TBARS). Se colocan 100µl de la muestra (en órganos, el sobrenadante del

homogenado con TCA), 50µl de HCl 0.6N y 1ml de Ácido Tiobarbitúrico (TBA) 0.12M en tris al 0.026M. Posteriormente se pone en baño maría a ebullición por 10 minutos y luego se determina la absorbancia a 535nm.

## **Método para Determinar Estrés Físico**

### ***Metodología para Determinar Corticosterona***

Se realizó con el kit de Inmunoensayo Enzimático (ELISA) de Corticosterona de Assay Designs (Ann Arbor, MI).

Se utiliza un anticuerpo policlonal para pegar la Corticosterona, se incuba a temperatura ambiente, se eliminan los excesos de sustancias y se añade el sustrato. Después de un periodo de incubación se detiene la reacción de la enzima y se observa un color amarillo, se lee a 405nm en un lector de microplacas.

## **Método para Determinar Proteínas**

### ***Metodología para Determinar Proteínas***

Se realizó mediante el método de Bradford (Kruger, 1994). Se evaluó la concentración de proteínas en la muestra del homogenado. Se realizó la curva estándar previamente con albúmina bovina (1mg/ml). Se colocaron 10µl del homogenado y con agua bidestilada se completó a 100µl, posteriormente se agregaron 2.5ml de la solución de Bradford, después de mezclarlos se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad por 10 minutos antes de hacer la lectura. Cada muestra por duplicado se lee a una absorbancia de 595nm.

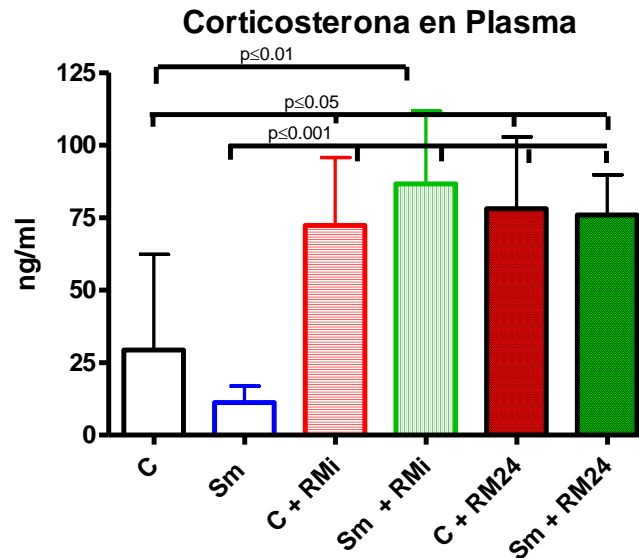
## **RESULTADOS**

Como se mencionó anteriormente se utilizaron cuatro grupos experimentales, dos de los cuales fueron sometidos a la RM por 2h (C+RM y Sm+RM) para provocar un estrés agudo. Estos se subdividieron en dos grupos, el primero fue sacrificado inmediatamente post-RM y el segundo fue sacrificado a las 24h post-RM.

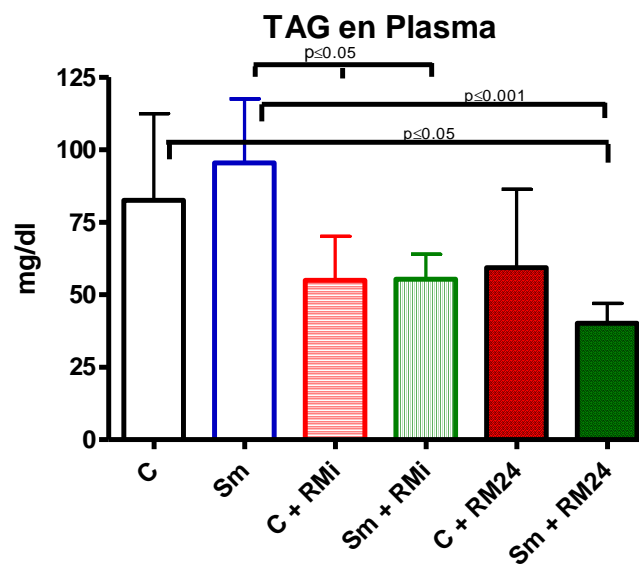
Los resultados serán presentados en dos apartados. El primero, se refiere a los resultados de las pruebas realizadas con el plasma obtenido de la sangre de los sujetos experimentales; y en el segundo, a los resultados de las pruebas realizadas en hígado.

### **Plasma**

*Estrés físico.* Para determinar si las ratas sometidas a la RM realmente sufrieron estrés físico, se evaluó la corticosterona en plasma. El análisis estadístico (ANOVA) de la concentración de corticosterona en plasma muestra una diferencia significativa entre C y Sm+RMi ( $p \leq 0.01$ ); entre C y C+RMi, C+RM24 y Sm+RM24 ( $p \leq 0.05$ ); y entre Sm y C+RMi, Sm+RMi, C+RM24 y Sm+RM24 ( $p \leq 0.001$ ). Lo anterior, indica que existió un aumento significativo en la concentración de corticosterona en comparación con los controles (C y Sm); sin embargo, no se observó una diferencia entre los grupos que se sometieron a la RM (Figura 5).



**Figura 5. Concentración de Corticosterona en plasma.** Los animales fueron alimentados con la dieta control (C) o con la dieta de *Spirulina maxima* al 5% (Sm) durante 7 días (n=12 c/u). Posteriormente se sometieron o no a RM por 2h y sacrificados inmediatamente o a las 24h post-RM (C+RMI, C+RM24, Sm+RMI y Sm+RM24, n=6 c/u). Las diferencias significativas entre las columnas señaladas por una barra se obtuvieron mediante ANOVA y la prueba post-hoc Bonferroni.



**Figura 6. Concentración de Triacilglicerol en plasma.** La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.



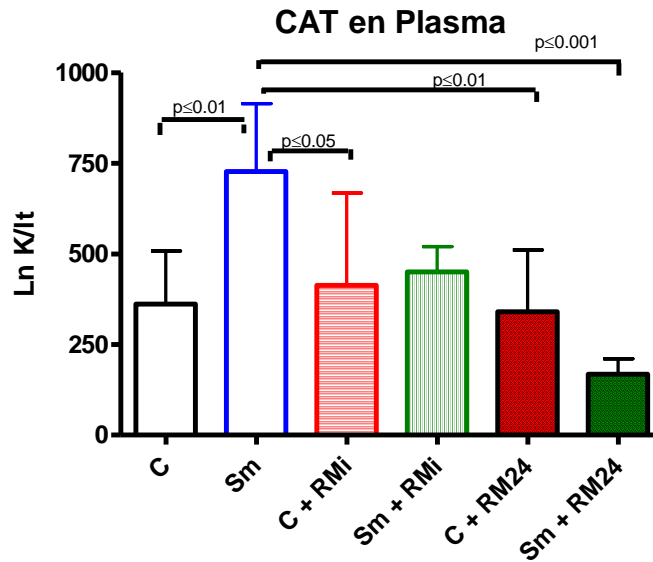
*Lípidos y Carbohidratos.* Los resultados del análisis de glucosa y lípidos (TAG, CT y Ac. Grasos Libres) en plasma se encuentran en la Figura 6 y en la Tabla 5. No hubo diferencia significativa entre los grupos en cuanto a Colesterol Total, Glucosa y Ácidos Grasos Libres. Sin embargo, se encontró que la concentración de TAG disminuyó significativamente en los grupos que se sometieron a la RM; sin embargo, la dieta con *Spirulina maxima* no afectó este resultado.

**Tabla 5. Perfil de Glucosa, Lípidos y SOD en Plasma.**

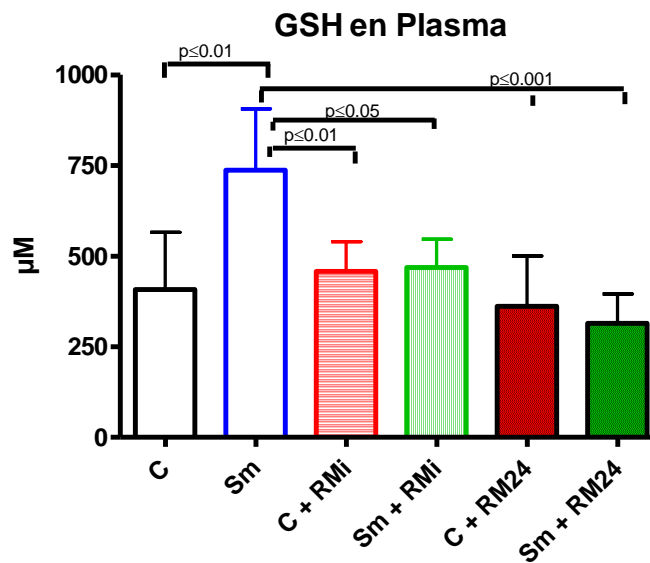
<b>Grupo Experimental</b>	<b>Glucosa mg/dl</b>	<b>Colesterol Total mg/dl</b>	<b>Ac. Grasos Libres mM</b>	<b>SOD U/ml</b>
<b>C</b>	103 ± 17	63.55 ± 8.5	0.30 ± 0.11	76.71 ± 1.68
<b>Sm</b>	98 ± 13	70.4 ± 16	0.33 ± 0.18	76.84 ± 1.28
<b>C + RMI</b>	118 ± 22	62.5 ± 15	0.38 ± 0.20	78.23 ± 0.74
<b>Sm + RMI</b>	94 ± 14	72.8 ± 11	0.22 ± 0.08	76.88 ± 0.92
<b>C + RM24</b>	106 ± 14	60.8 ± 19	0.26 ± 0.11	77.10 ± 1.34
<b>Sm + RM24</b>	119 ± 23	62 ± 12	0.21 ± 0.07	77.31 ± 0.91

La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.

*Estrés Oxidativo.* Para valorar la influencia del estrés físico sobre el estrés oxidativo se midió, SOD, CAT, GSH y TBARS, en plasma. Los resultados de la actividad de SOD se encuentran en la tabla 5 en la que se observa que no hubo diferencia significativa entre los grupos. En las Figuras 7, 8 y 9 se encuentran los resultados de la actividad de CAT, la concentración de GSH y de TBARS, respectivamente.



**Figura 7. Actividad de Catalasa en plasma.** La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.

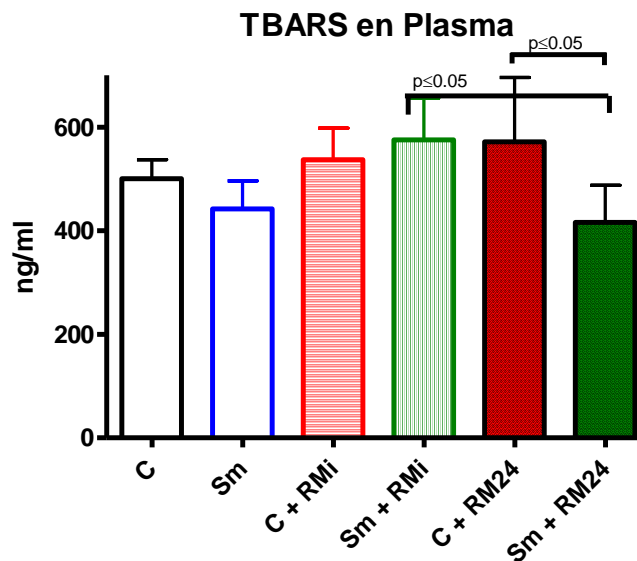


**Figura 8. Concentración de Glutatión Reducido en plasma.** La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.

Hubo diferencia significativa en la actividad de CAT entre los controles (C y Sm), siendo más alta en el grupo Sm ( $p \leq 0.01$ ), indicando que la *Spirulina maxima* aumenta la actividad de CAT. Aunque la actividad de CAT disminuyó en los grupos con RM, éstos sólo son significativamente diferentes al control Sm. Lo cual puede sugerir, que la *Spirulina maxima* aumenta las defensas antioxidantes.

En GSH, se observa que existe una diferencia significativa entre los controles (C y Sm), sin embargo no existe diferencia entre los grupos sometidos a RM. Se encontró que los grupos sometidos a la RM son diferentes al grupo control Sm, ya que éste se encuentra aumentado.

Se encontró que la RM produce una tendencia a aumentar los TBARS en plasma. No obstante, esta diferencia no fue significativa con los grupos control (C y Sm); sin embargo, a las 24h post-RM, el grupo alimentado con *Spirulina* (Sm+RM24) disminuyó el cúmulo de TBARS, mostrando una diferencia significativa con los grupos Sm+RMi y C+RM24. Lo que sugiere que regresó a sus niveles basales más eficientemente.



**Figura 9. Concentración de TBARS en plasma.** La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.

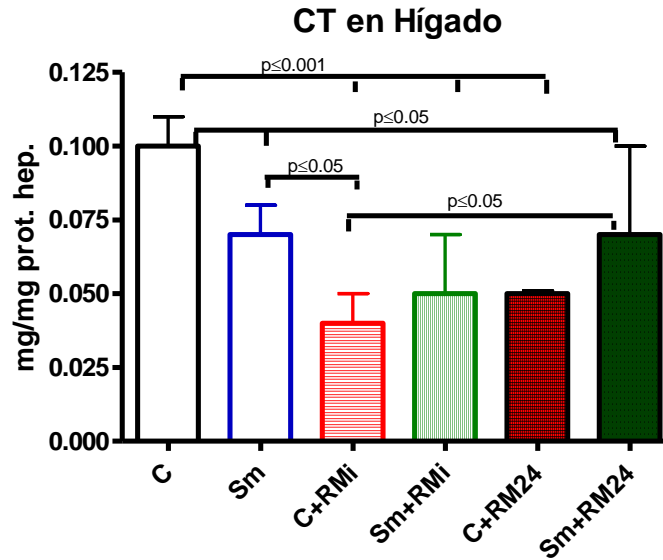
## **Hígado**

*Lípidos.* Para evaluar lípidos en hígado se consideraron los siguientes marcadores: CT, TAG y Ácidos Grasos Libres (Figuras 10, 11 y 12 respectivamente).

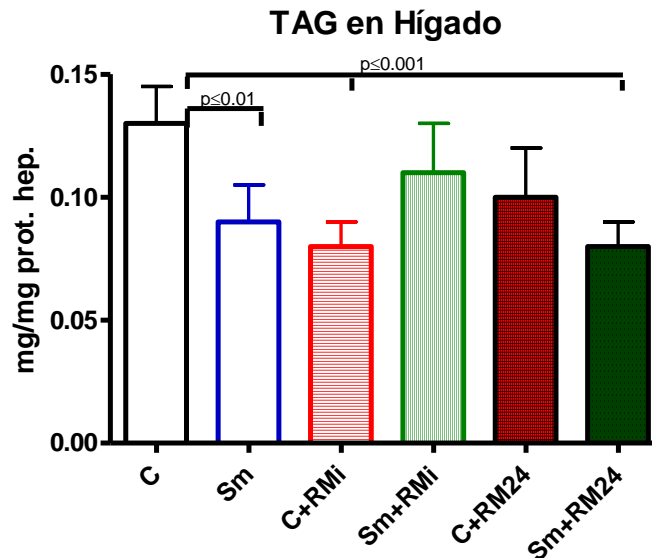
En CT se observa que el grupo alimentado con *Spirulina maxima* (Sm) tiene valores más bajos que los que no se alimentaron con esta (C). Por otro lado, la RM induce una disminución del contenido de CT hepático de forma inmediata en ambos grupos, misma que es contrarrestada más eficientemente en el grupo Sm+RM24 regresando a sus valores basales más rápidamente que el grupo C+RM24. Estos resultados podrían ser explicados por los cambios hemodinámicos inducidos por el estrés físico (RM).

En TAG se observa que existe una diferencia significativa entre los grupos control (C y Sm), estando su concentración disminuida en el grupo Sm. De igual manera la RM induce una disminución inmediata en el grupo C+RMi que se recupera a las 24h (C+RM24). La RM no indujo diferencias significativas en los grupos alimentados con *Spirulina maxima* (Sm vs Sm+RMi y Sm vs Sm+RM24).

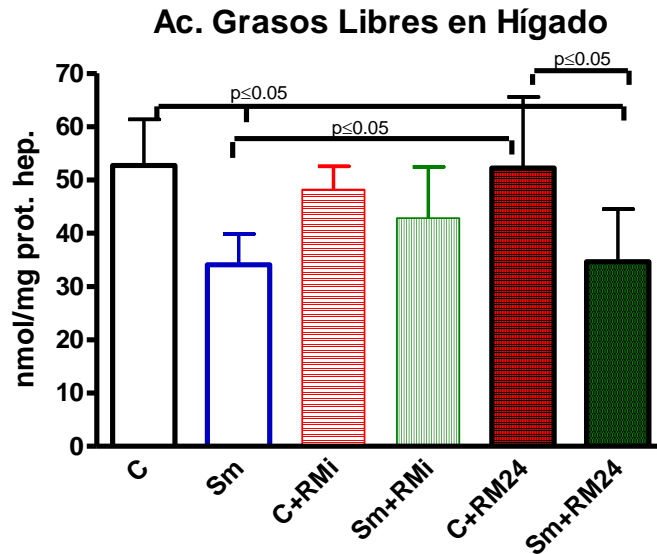
En cuanto a los Ácidos Grasos Libres en hígado, se observa que existe una diferencia significativa entre los grupos control (C y Sm), ya que el grupo Sm tienen una menor concentración. Se encontró que existe diferencia entre los grupos sometidos a la RM a las 24h, en donde el grupo Sm+RM24 se encuentra disminuido, con lo cual ambos regresan a sus valores iniciales. No se observaron efectos por la RM sí por la *Spirulina maxima*. Ya que los Ácidos Grasos Libres son un indicador de daño hepático, se puede concluir que la *Spirulina* protege al hígado.



**Figura 10. Concentración de Colesterol Total en Hígado.** La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.



**Figura 11. Concentración de Triacilgliceroles en Hígado.** La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.

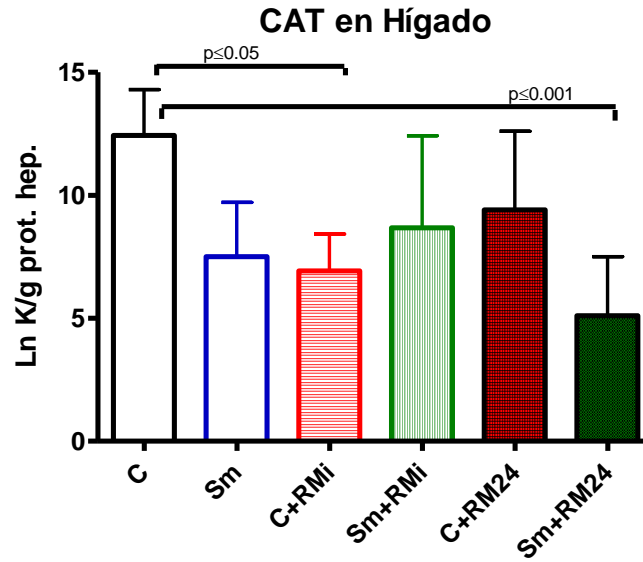


**Figura 12. Concentración de Ácidos Grasos Libres en Hígado.** La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.

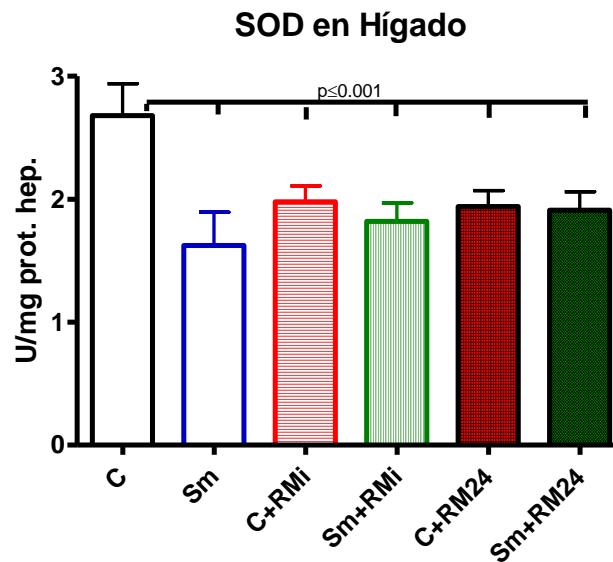
*Estrés Oxidativo.* Se tomaron en cuenta los siguientes indicadores de estrés oxidativo: actividad de CAT, actividad de SOD, concentración de TBARS y de GSH, los cuales se encuentran en las Figuras 13, 14 y 15 y en la Tabla 6 respectivamente.

En CAT, sólo se observó una disminución inmediata en la actividad de CAT en el grupo C+RMi. De los grupos alimentados con *Spirulina maxima*, se encontró que sólo el grupo Sm+RM24 mostró una diferencia significativa con el grupo C, pero no hubo diferencias entre los grupos Sm.

Respecto a SOD se observó que tanto la *Spirulina* como la RM inducen una disminución en la actividad de la SOD hepática, mismos que no son aditivos, no se recuperan a las 24h y pueden actuar de manera diferente. Los grupos Sm no fueron afectados por la RM; sin embargo, se encontró que el grupo C disminuyó sus valores de SOD al estar sometidos los sujetos experimentales a la RM.

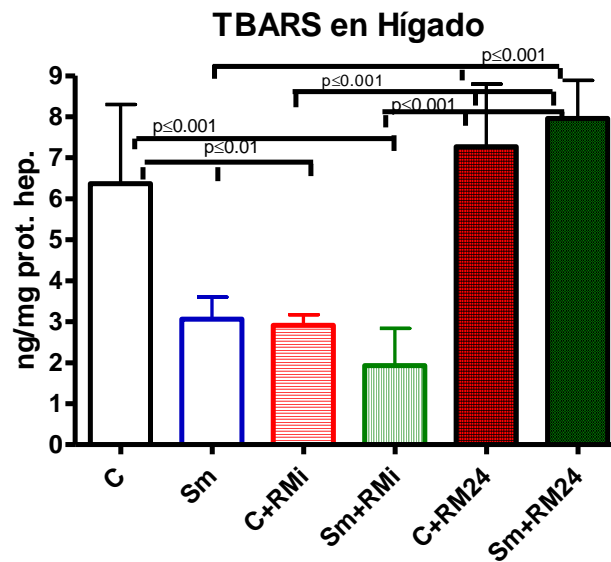


**Figura 13. Actividad de Catalasa en Hígado.** La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.



**Figura 14. Actividad de SOD en Hígado.** La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.

En TBARS se observó una diferencia entre los grupos control (C y Sm), ya que existen un menor cúmulo de TBARS en Sm. En el grupo C se encontró, de forma inmediata, que el grupo C+RMi disminuyó significativamente al compararlo con su control (C); no obstante se observa que a las 24 post-RM se incrementa la concentración de TBARS (C+RM24), sin embargo este incremento no es diferente al nivel basal C. Por otro lado, el grupo Sm no mostro diferencias de forma inmediata (Sm+RMi), pero si incremento a las 24h post-RM (Sm+RM24); sin embargo, este aumento no fue diferente del observado en el grupo C+RM24 ni con C.



**Figura 15. Concentración de TBARS en Hígado.** La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.



En GSH no se observaron diferencias significativas entre los grupos.

**Tabla 6. Concentración de GSH en Hígado**

<b>Grupo Experimental</b>	<b>GSH μMol/mg prot</b>
<b>C</b>	4.77 ± 0.79
<b>Sm</b>	4.3 ± 1.58
<b>C + RMi</b>	5.6 ± 1.74
<b>Sm + RMi</b>	5.68 ± 2.68
<b>C + RM24</b>	6.6 ± 0.62
<b>Sm + RM24</b>	7.17 ± 1.05

La simbología de los grupos es como lo indicado en la Figura 5.

## **DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN**

La RM fue útil, ya que reproduce uno de los indicadores de estrés físico (corticosterona) y nos muestra los cambios fisiológicos en el sistema antioxidante y la modificación de los lípidos en respuesta al estrés físico. Por otro lado, la *Spirulina maxima* disminuye estos cambios en el sistema antioxidante y en el metabolismo de lípidos, fundamentalmente en plasma.

De igual forma, se considera que la RM es un método recomendable para inducir estrés ya que es accesible, fácil de reproducir, tiene menos variables extrañas y sólo requiere la inversión de las jaulas de RM. Sin embargo, el éxito de la RM depende del grado de inmovilidad en el que se encuentre la rata, ya que a mayor movilidad menor estrés. Algunos modelos (García y cols., 2009; Fortunato y cols., 2009) utilizan varios métodos para inducir estrés, los cuales se van alternando por día, esto provoca que no exista gran control sobre los sujetos experimentales ya que intervienen más variables extrañas. En el presente experimento, se cuidó que el tamaño de la jaula fuera apropiado al tamaño de los sujetos experimentales utilizados.

El periodo de 12h de ayuno pudo contribuir a aumentar el estrés en los sujetos experimentales; no obstante, es un requisito para conocer la concentración basal de lípidos en sangre, por lo cual, se considera que debido a que se obtuvieron resultados comparables a los encontrados en la literatura bajo otros modelos experimentales (García, 2006) la contribución del ayuno al grado de estrés fue mínima, si es que hubo.

Se conoce, que la corticosterona es un indicador confiable de estrés físico (García, 2006). Se ha observado que la concentración de corticosterona aumenta en ratas sometidas a la RM (Şahin & Gümüşlü, 2006; Touyarot & Sandi, 2002). Paskitti y cols. (2000), reportaron que los niveles de corticosterona aumentan desde los 15min post-RM en un estrés agudo en ratas. Los resultados obtenidos en este trabajo concuerdan con los antes mencionados, lo cual indica que bajo las condiciones experimentales utilizadas, se reproduce el estrés agudo.

Por otra parte, es conocido que las situaciones de estrés conllevan a un aumento de la glucosa y de los ácidos grasos libres plasmáticos, estos últimos, productos de la degradación de los TAG del adipocito. Estos cambios, se acompañan de alteraciones hemodinámicas, en donde se debe asegurar el aporte sanguíneo al cerebro y a la masa muscular a costa de disminuir la circulación en vísceras y piel (Díaz-Zagoya & Juárez-Oropeza, 2007). En el presente trabajo, no se observaron diferencias significativas en la concentración de glucosa y ácidos grasos libres plasmáticos; sin embargo, se pudo observar una disminución en los TAG plasmáticos y hepáticos, así como un aumento en los ácidos grasos libres hepáticos. Estos cambios fueron atenuados por la administración de *Spirulina maxima*, y concuerdan con otros resultados observados en diferentes modelos de inducción de estrés por sustancias químicas como: tetracloruro de carbono, dieta rica en fructosa y en administración de acetato de plomo (Torres-Durán y cols., 2006; Belay & Gershwin, 2007; Ponce-Canchihuamán y cols., 2010). Por otro lado, los resultados hepáticos concuerdan con otros reportes, donde se indica que la *Spirulina maxima* estabiliza el metabolismo de lípidos en el hígado bajo diferentes condiciones experimentales (Ponce-Canchihuamán y cols., 2010; Torres-Durán y cols. 2006).

Además, es importante mencionar que la RM induce una disminución en el contenido de CT hepático de forma inmediata. Hasta la fecha, este hallazgo no ha sido reportado, por lo que representa una contribución hacia los indicadores de estrés agudo y merece posteriores estudios. Además, la *Spirulina maxima* revirtió más eficientemente este cambio.

Se ha demostrado que el estrés, físico y psicológico, se acompaña de estrés oxidativo (Martínez-Sámano y cols., 2010). En el presente estudio se observó que la CAT y SOD disminuyen en hígado por la RM, lo que se refleja en una disminución inmediata y un mayor cúmulo de TBARS a las 24h. Estos cambios fueron atenuados por la *Spirulina maxima*. Además, la administración de *Spirulina* aumenta la actividad de CAT y la concentración de GSH en plasma, lo que concuerda con lo reportado por Ranga y cols. (2010) al administrar *Spirulina platensis* en una dosis única y analizar el curso temporal de la actividad de CAT y SOD en plasma, en donde se muestra que la *Spirulina* aumenta la actividad de CAT, y sugiere que esto se debe a los carotenoides que contiene la

*Spirulina*; los resultados de GSH concuerdan con los observados en atletas que consumen *Spirulina* (Kalafati, 2010).

Considerando el análisis de los indicadores de estrés oxidativo, en conjunto, se demuestra que la *Spirulina maxima* aumenta las defensas antioxidantes. Al mostrar una atenuación en los cambios fisiológicos inducidos por el estrés, la *Spirulina maxima* podría ser útil en algunos padecimientos asociados a situaciones estresantes.

En esta primera etapa, en la cual se evaluaron los cambios fisiológicos inducidos por la RM y su afectación por la *Spirulina maxima*, se encontró que ésta atenúa dichos cambios en los indicadores de estrés oxidativo y en el metabolismo de lípidos. Se considera que sería de gran importancia conocer, en una etapa posterior, si estos cambios se ven reflejados en algunos indicadores de estrés psicológico como inmovilidad, nado y escalamiento (Guadarrama y cols., 2010), así como si estos cambios continúan en un modelo de estrés crónico, el cual induce depresión, como se ha reportado en otros estudios.

Dado que el estrés agudo inducido por la RM (2h) provoca cambios observables inmediatamente y a las 24h post-RM, que se reflejan en los análisis aquí mostrados, es deseable conocer más la extensión de estos efectos en el tiempo, así como los cambios inducidos por la administración repetida de RM.

Finalmente, las ratas alimentadas con *Spirulina maxima* tuvieron menos reacciones fisiológicas negativas ante el estrés agudo, en comparación con las ratas alimentadas sin *Spirulina maxima* al 5%.

Es deseable que el psicólogo conozca los cambios fisiológicos y bioquímicos que suceden al estar sometido a una situación estresora, así como los métodos con los cuales se pueden medir las variables cuantitativas y cualitativas producto de ésta; aunque el psicólogo estudia la conducta, es importante que maneje ambos métodos experimentales y sea capaz de interpretarlos. En la actualidad, se sugiere que los trabajos del Área de la Salud sean realizados de forma multidisciplinaria, por lo que, es importante que se conozcan los cambios fisiológicos y bioquímicos que anteceden o

preceden a un padecimiento. De igual forma, en el ámbito institucional, el psicólogo frecuentemente recibe pacientes referidos por psiquiatras o médicos, por lo cual es recomendable que éste conozca algunos términos médicos relevantes, así como el funcionamiento del cuerpo humano. Dado que la *Spirulina maxima* es un producto natural, complemento alimenticio y accesible económicamente, ésta puede ayudar en la prevención de enfermedades y servir como complemento al tratamiento alópata, indicado por el médico, para mejorar la calidad de vida de la persona.

## **REFERENCIAS**

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. Methods Enzymol. 105:121-6.
- Armario, P. (2003). Estrés, Enfermedad Cardiovascular e Hipertensión Arterial. Anales de Cirugía Cardíaca y Vascul. p. 226-234.
- Bale, T.L. (2005). Sensitivity to Stress: Dysregulation of CRF Pathways and Disease Development. Horm Behav 48:1–10.
- Belay, A. & Gershwin. M. (2007). Spirulina in Human Nutrition and Health. Estados Unidos: CRC Press.
- Chamorro, G., Salazar, M., Araujo, K., dos Santos, C., Ceballos, G. & Castillo, L. (2002). Update on the Pharmacology of Spirulina (Arthrospira), an unconventional food. Arch Latinoam Nutr. 52:232-40.
- Díaz-Zagoya, J. & Juárez-Oropeza, MA. (2007). Bioquímica: un Enfoque Básico Aplicado a las Ciencias de la Vida. India: McGrawHill.
- Fontana, D. (1992). Control del Estrés. México: Manual Moderno.
- Fortunato, J., Réus, G., Kirsch, T., Stringari, R., Fries, G., Kapczinski, F., Hallak, J., Zuardi, A., Crippa, J. & Quevedo, J. (2009). Effects of  $\beta$ -Carboline Harmine on Behavioral and Physiological Parameters Observed in the Chronic Mild Stress Model: Further Evidence of Antidepressant Properties. Brain Res Bull. doi: 10.1016/j.brainresbull.2009.09.008
- García, A. (2006). El Estrés Psicológico Modula la Actividad de las Neuronas TRHérgicas en el Sistema Límbico. Tesis de Maestría en Ciencias Bioquímicas. UNAM.

- García, L., Comim, C., Valvassori, S., Réus, G., Stertz, L., Kapczinski, F., Gavioli, E. & Quevedo, J. (2009). Ketamine Treatment Reverses Behavioral and Physiological Alterations Induced by Chronic Mild Stress in Rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 33: 450-455
- Gershwin, M. & Belay, A. (2008). *Spirulina* in Human Nutrition and Health. New York: CRC Press.
- Gilmer, W. & McKinney, W. (2003) Early Experience and Depressive Disorders: Human and Non-Human Primate Studies. *J Affect Disord* 75:97–113.
- Guadarrama, G., Vega, E., Vázquez, G., Aguilar, F. & Jaime, H. (2010). Propiedades Hipoglucemiante y Antidepresiva de *Tagetes lucida cav.*. En: XXVIII Congreso Nacional de Bioquímica. Tuxtla Gutiérrez, Chis. Noviembre 7-12, Poster 558.
- Harro, J. & Oreland, L. (2001). Depression as a Spreading Adjustment Disorder of Monoaminergic Neurons: a Case for Primary Implication of the Locus Coeruleus. *Brain Res Rev* 38:79–128.
- Holmes, TH. & Rahe, RH. (1967) The Social Readjustment Rating Scale. *Journal of Psychosomatic Research*, 11, 213-218.
- Kalafati, M., Jamurtas, A., Nikolaidis, M., Paschalis, V., Theodorou, A., Sakellariou, G., Koutedakis, Y. & Kouretas, D. (2010). Ergogenic and antioxidant effects of *Spirulina* supplementation in humans. *Med Sci Sports Exerc*. 42(1):142-51.
- Kay, R. (1991). Microalgae as Food and Supplement. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 30(6):555-573.
- Kono, Y. (1978). Generation of Superoxide Radical During Autoxidation of Hydroxylamine and an Assay for Superoxide Dismutase. *Arch. Biochem. Biophys*. 186:189-95.

- Karasek, R. (1998). Demand/control model: A Social, Emotional and Physiological Approach to Stress Risk and Active Behavior Development. Encyclopedia of Occupational Health and Safety. Ginebra: OIT.
- Kruger, N. (1994). The Bradford Method for Protein Quantitation. Methods Mol. Biol. 32:9-15.
- La Jornada. (2009, enero 29). Presentan estrés laboral 30% de los trabajadores en México: UNAM. Extraído el 18 de noviembre de 2010 desde: <http://www.jornada.unam.mx/2009/01/29/index.php?section=sociedad&article=049n2soc>
- Lazarus, R. & Folkman, S. (1986). Estrés y Procesos Cognitivos. Barcelona: Martínez Roca.
- López, D. (2005). Estrés, Epidemia del Siglo XXI: Cómo Entenderlo, Entenderse y Vencerlo. 3ª edición. Buenos Aires: Grupo Editorial Lumén.
- López-Ibor, J & Valdés M. (2002). DSM-IV-TR: Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales. España: Masson.
- Martínez-Sámano, J., Torres-Durán, P., Elías-Viñas, D., Juárez-Oropeza, MA. & Verdugo-Díaz, L. (2010). Effects of Acute Electromagnetic Field Exposure and Movement Restraint on Antioxidant System in Liver, Heart, Kidney and Plasma of Wistar Rats: a Preliminary Report. Int. J. Radiat. Biol.
- Mckinney, W. (1988). Models of Mental Disorders: A New Comparative Psychiatry. Estados Unidos: Plenum Medical.
- Miller, L. (2010). Los Distintos Tipos de Estrés. Extraído el 6 de marzo de 2011. Desde: <http://www.apa.org/centrodeapoyo/tipos.aspx>
- Moberg, G.P. & Mench J.A. (2001). The Biology of Animal Stress: Basic Principles and Implications for Animal Welfare. UK: CABI Publishing.



- Moreno, A. (2007). Estrés y Enfermedad. Frontera Dermatológica. No.1
- Negrete, G. (2008, diciembre 14). En Aumento el Estrés Laboral. Tribuna de San Luis. Extraído el 18 de noviembre de 2010 desde: <http://www.oem.com.mx/tribunadesanluis/notas/n969869.htm>
- Norma Oficial Mexicana. (1999). Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. NOM-062-ZOO-1999.
- Ohkawa, H., Ohishi, N. & Yagi, K. (1979). Assay for Lipid Peroxides in Animal Tissues by Thiobarbituric Acid Reaction. Anal Biochem. 95:351-8.
- OMS. (2007) ¿Qué es la salud mental? Obtenido el 6 de marzo del 2001 desde: [http://www.who.int/topics/mental\\_health/es/](http://www.who.int/topics/mental_health/es/)
- Owens, C. & Belcher, R. (1965). Colorimetric Micro-Method for the Determination of Glutathione. Biochem J. 94:705-11.
- Paskitti, M., McCreary, B. & Herman, J. (2000). Stress regulation of adrenocorticosteroid receptor gene transcription and mRNA expression in rat hippocampus: time-course analysis. Brain Res Mol Brain Res; 80: 142-152.
- Ponce-Canchihuamán, J., Pérez-Méndez, O., Hernández-Muñoz, R., Torres-Durán, PV. & Juárez-Oropeza, MA. (2010). Protective Effects of Spirulina maxima on Hiperlipidemia and Oxidative-Stress Induced by Lead Acetate in the Liver and Kidney. Lipids in Health and Disease 9:35. doi: 10.1186/1476-511X-9-35
- Ramírez-Moreno, L. & Olvera-Ramírez, R. (2006, septiembre). Uso Tradicional y Actual de Spirulina sp. (arthrospira sp.). INCI, vol.31, no.9, p.657-663. ISSN 0378-1844.
- Ramos, A. & Mormede, P. (1998). Stress and Emotionality: a Multidimensional and Genetic Approach. Neurosci Behav Rev; 22. p. 33-57.

- Ranga, A., Raghunath, RL., Baskaran, V., Sarada, R. & Ravishankar, G. (2010). Characterization of microalgal carotenoids by mass spectrometry and their bioavailability and antioxidant properties elucidated in rat model. J Agric Food Chem. 58(15):8553-9.
- Şahin, E. & Gümüşlü, S. (2006). Immobilization stress in rat tissues: Alterations in protein oxidation, lipid peroxidation and antioxidant defense system. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C 144: 342–347.
- Selye, H. (1973). Stress of Life. Montreal: La Presse.
- Storz, G. & Zheng, M. (2000). Bacterial Stress Responses. Washington: ASM Press.
- Torres-Durán, PV., Miranda-Zamora, R., Paredes-Carbajal, M., Mascher, D., Díaz-Zagoya, J. & Juárez-Oropeza MA. (1998). *Spirulina maxima* Prevents Induction of Fatty Liver by Carbon Tetrachloride in Rat. Biochem Mol Biol Internat. 44(4):787-793.
- Torres-Durán, PV., Paredes-Carbajal, M., Mascher, D., Zamora-González, J., Díaz-Zagoya, J. & Juárez-Oropeza, M.A. (2006). Protective Effects of *Arthospira maxima* on Fatty Acid Composition in Fatty Liver. Arch Med Res 37:479-483
- Touyarot, K. & Sandi, C. (2002). Chronic Restraint Stress Induces an Isoform-Specific Regulation on the Neural Cell Adhesion Molecule in the Hippocampus. Neural Plasticity, vol. 9 no.3.
- Williams, S. & Cooper, L. (2004). Manejo del Estrés en el Trabajo: Plan Detallado para Profesionales. México: Manual Moderno.
- Willner, P. (2005). Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioral-Neurobiological Concordance in the Effects of CMS. Neuropsychobiology 52:90–110.