



**UNIVERSIDAD MICHOCANA DE SAN NICOLÁS
DE HIDALGO**



FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA SEPARACIÓN MATERNAL Y EL AISLAMIENTO
SOCIAL EN LA ADOLESCENCIA SOBRE LA VULNERABILIDAD AL ESTRÉS Y SU
RELACIÓN CON MARCADORES DE SÍNDROME METABÓLICO EN RATAS**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

PRESENTA

JAVIER VARGAS LEÓN

ASESOR DE TESIS

D.C. NAIMA LAJUD AVILA

Morelia Mich. Septiembre 20015.

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Neurobiología del Desarrollo de la División de Neurociencias del Centro de Investigación Biomédica de Michoacán del Instituto Mexicano del Seguro Social, en el marco del protocolo de investigación titulado: "Efecto del aumento de la prolactina en la leche materna sobre las alteraciones neuroendocrinas causadas por la exposición al estrés durante el desarrollo y los factores de riesgo de síndrome metabólico" con número de registro ante el comité local de investigación no: R-2010-1602-35. El cual, contó con apoyo financiero del fondo de investigación en salud No: FIS/IMSS/G11/976.

DEDICATORIA

A Dios:

Por darme la oportunidad de vivir, por haberme permitido llegar hasta este punto, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente para no desistir en esta mi gran meta y por haber puesto en mi camino a aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio.

A mi madre Lupita:

Por haberme dado la fuerza suficiente de seguir, por su inmenso apoyo y tiempo invertido, por su perseverancia y fuerza para soportar mi ausencia, por sus consejos y valores, pero sobre todo por su gran amor.

A mi padre Javier:

Por los ejemplos de perseverancia y constancia que lo caracterizan y que me ha infundado siempre, por el valor mostrado para salir adelante y ser un hombre de bien, por su inmenso apoyo y tiempo invertido y por su amor.

Gracias papás, por ser el pilar fundamental en todo lo que soy, en toda mi educación, tanto académica como de la vida y por su incondicional apoyo perfectamente mantenido a través del tiempo.

Todo este trabajo ha sido posible gracias a ellos.

A mis Familiares:

A mi única hermana Sandy Vargas, por comprender la distancia y confiar en mí, al ser que iluminó más nuestra familia, mi sobrino Mateo. A mi abuelita Otilia Arroyo por su gran amor y oraciones hacia mí. A mi prima favorita, Brenda Gonzales por sus risas y compañía, por ser mi más grande cómplice. A mis tías Gaby, Alondra y Lorena Vargas por sus ánimos. Y a todos los Vargas por ser parte de mi vida. ¡Gracias a todos!

A mis amigos:

Quiero agradecer con gran entusiasmo a Esteban Torres Dimas por sus consejos y ánimos, alegrías y tristezas, pero sobre todo por su gran apoyo y cariño. A mi más grande amigo, Jesús Macías por confiar en mí desde un principio, por su apoyo y magnífica amistad. A Paola Torres y Zuguey Madriz por hacer mi último año más liviano con su hermosa compañía y ayudarme a liberar estrés con esas grandiosas aventuras.

A mis amigos y compañeros de sección 11, que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional, los cuales viajaron a mi lado en esta gran travesía; a

Miriam Rodríguez, Mary Villa, Monica Valdespino, Rogelio Zavala, Lesly Ontiveros, Rodrigo Ríos, Liz Villa, Lizet, Luli, Lupita, Ely, Elisa, Manuel, Keyra, Flor, Viry, Celia, Denisse, Adriana, Ady, Ana y en general a mis amigos de la facultad; Hugo Fernández, Carlos Hernández y Lupita Castro que hicieron que mi estancia y mi vida de estudiante fuera más amena, sin ellos esto hubiera sido más difícil, gracias por su grata amistad. A aquéllos que marcaron una sonrisa; Lalo, Betza, Karla, Artur, Nancy, Pato, Noé, Jocelyn, Andy, Gera, Lau, Mary, Ángel, Torchon, Neto, Andrés, Anita, Harry, Ever y Jared. A cada uno de ustedes. Gracias.

Cómo olvidar a los que fueron mi segunda familia y compartimos techo y comida; Paty, Afro, Vane y Jacob juntos, nuestra vida de universitarios era más amena. Gracias.

A mi gente y amigos de la tierra que me vio nacer, que demostraban su apoyo desde lejos; a Janeth Pimentel y Carla Moreno por su amor y cariño, a Miguel Ángel, Juan Manuel y Diego que hacían que mis visitas fueran gratas, Pollo y Yadira los cuales me han demostrado su apoyo y cariño, a todos los que fueron parte de una etapa muy importante en mi vida (Enicri) y a Jariany que estuvo en un principio y fue partícipe de esta gran aventura.

A mis maestros:

A mis maestros, aquéllos que marcaron cada etapa de mi camino universitario. A mi Doctora y jefa, quien me ayudó en asesorías y dudas presentadas en la elaboración de la tesis, con lo cual estoy sumamente agradecido. Gracias Naima Lajud por ser mi guía y maestra en esta difícil labor, por tus conocimientos compartidos, paciencia y grata compañía. A la Dra. Luz por su amabilidad, hospitalidad, y su valioso conocimiento aportado, a la Dra. Esperanza por su gran apoyo y colaboración, a mis revisores de tesis el Dr. Rosalío, Dr. Godínez y al Dr. Urquiza por aceptar, aportar y ser parte de este gran proyecto.

Por último y no menos importante al CIBIMI y su director, por recibirme y permitir desarrollar mi proyecto de tesis, a los chicos del laboratorio; a Nancy Valenzuela por su gran apoyo y hermosa amistad, a Quique, Marlene y Marion por su grato compañerismo.

A todos y cada uno de los presentes en mi vida y no nombrados, mi más grande agradecimiento, hoy queda plasmado una etapa muy importante en mi vida para dar pie al gran futuro con éxito y bienestar que me espera.

¡GRACIAS!

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	8
MARCO TEÓRICO	10
El estrés	10
La respuesta al estrés	11
Carga alostática	13
Síndrome metabólico y diabetes mellitus	15
Relación entre el estrés, la depresión y el síndrome metabólico	18
Exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida	20
Modelo animal	22
ANTECEDENTES	24
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	25
METODOLOGÍA Y MATERIALES	26
RESULTADOS DISCUSIÓN	32
CONCLUSION	40
REFERENCIAS BIOBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	50
Lista de abreviaturas	50
Índice de figuras	52
Índice de tablas	52
	53

RESUMEN

Los niveles elevados de glucocorticoides (GC) aumentan el riesgo de enfermedades metabólicas y cardiovasculares. La separación maternal (SM) en ratas es un modelo de exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida (early life stress, ELS) que programa la actividad del eje hipotálamo – hipófisis – glándulas suprarrenales (HPA), aumenta la concentración basal de GC, la conducta tipo depresiva y la respuesta al estrés en la etapa adulta. El aislamiento social posterior al destete es un estresor psicosocial crónico que aumenta el consumo de alimento y la ganancia de peso en los animales SM; no obstante, la interacción entre la SM y el aislamiento social sobre marcadores de vulnerabilidad metabólica y su relación con la respuesta al estrés no se ha evaluado. En el presente trabajo evaluamos el efecto la SM y el aislamiento social en ratas de dos meses de edad. Las camadas de las ratas fueron sometidas a 3 horas diarias de separación maternal a partir del día postnatal (P) uno al 14 (sometidas a 32°C en un cuarto independiente a la colonia) o permanecieron como controles (CONT). Los animales fueron destetados al día postnatal 21 (P21) y se mantuvieron en aislamiento social o bajo condiciones estándar de bioterio (grupos de 3-4 machos por caja). Al día postnatal 60 (P60) se evaluó la conducta de los animales en la prueba de nado forzado y posteriormente se les implantó un catéter en la vena yugular. Después de una semana de recuperación evaluamos las concentraciones de corticosterona en plasma tanto en condiciones basales como en respuesta al estrés (2 min de nado en agua fría) y la curva de tolerancia a la glucosa. Observamos que tanto el aislamiento social como SM causan una estrategia pasiva en la prueba de nado forzado; sin embargo el análisis estadístico reveló que mientras que el aislamiento social después del destete tiene un efecto mayor que la SM sobre la reactividad al estrés, solamente los grupos SM mostraron alteraciones metabólicas en la curva de tolerancia a la glucosa. No observamos diferencias significativas en la concentración de triglicéridos ni de colesterol, no obstante los animales separación maternal aislados (SM-A) mostraron un aumento del 9.1% en el peso corporal. En conclusión, nuestros resultados sugieren que la SM y el aislamiento social aumentan la vulnerabilidad al estrés y la vulnerabilidad metabólica de forma diferencial.

ESTRÉS, SÍNDROME METABÓLICO, AISLAMIENTO SOCIAL, GLUCOCORTICOIDES, HIPOTÁLAMO.

ABSTRACT

Elevated Glucocorticoid levels (GC) increase metabolic and cardiovascular risk. Maternal separation (SM) is an early life stress rodent model that programs Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis (HPA) activity, increases basal GC levels, depressive like behavior and further adult stress vulnerability. Post weaning social isolation is a chronic stressor that induces hyperphagia and increased weight gain in MS rats; however, whether MS interacts with AISL, to increase metabolic vulnerability later in life is rather unknown. In here we evaluated the effect of periodic MS and post weaning social isolation on stress and metabolic parameters in two month old male sprague dawley rats. Litters were subjected to 3 hours of daily MS from postnatal day one to 14 (32°C in an independent room from the colony) or remained as undisturbed controls (CONT). Animals were weaned at postnatal day (P) 21 and randomly assigned to social isolation or standard housing until adulthood. At P60 animals were tested on the forced swim test and underwent a jugular vein catheterization procedure. After a one week recovery time, we evaluated basal and stress induced (2min cold swim) corticosterone levels and the glucose tolerance test. Both SM and post weaning social isolation caused a passive coping strategy in the forced swimming test; however, statistical analysis revealed that, while AISL effect on stress reactivity was stronger than MS, only maternally separated groups showed metabolic alterations in the glucose tolerance test. Triglycerides, cholesterol and epididymal fat deposition were unchanged across treatments, although SM-AISL group showed a $9.1 \pm 1.8\%$ increase in total body weight. In conclusion, our results indicate that MS and social insolation differentially affect stress and metabolic vulnerability without further interaction.

INTRODUCCIÓN

El estrés es un conjunto de respuestas fisiológicas que se activan ante situaciones percibidas como potencialmente nocivas, peligrosas o desagradables¹. La exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida (ej: maltrato infantil, abuso sexual, desnutrición o abandono) puede tener consecuencias psicológicas y neurológicas irreversibles y se correlaciona con una mayor probabilidad de padecer patologías relacionadas con el estrés como la depresión, la ansiedad y el síndrome metabólico^{2,3}. El cerebro humano continúa desarrollándose durante la niñez, la adolescencia e incluso el período adulto y es éste, quien determina qué es lo amenazante, y por ello, potencialmente estresante; al mismo tiempo activa las respuestas fisiológicas necesarias para contender con el estresor⁴. A largo plazo, los individuos que sufrieron experiencias adversas durante las etapas tempranas de la vida muestran una desregulación del eje neuroendocrino del estrés (HPA) y una mayor vulnerabilidad ante estresores nuevos². Se cree que la mayor incidencia de patologías observada en estos individuos es causada por esta desregulación y la subsecuente elevación de los niveles de glucocorticoides. Debido a que los GC tienen un efecto importante sobre la modulación del estado de ánimo y la homeostasis de la glucosa, los elementos medioambientales que generan estrés en individuos vulnerables (doble reto), podrían hacer una importante contribución para el desarrollo de depresión, síndrome metabólico, resistencia a la insulina y/o diabetes; sin embargo, esta posibilidad aún no se ha evaluado directamente. El modelo animal más utilizado para evaluar los efectos de la exposición al estrés durante las etapas tempranas de la vida es la separación maternal (SM) en roedores. Este modelo consiste en separar a las crías de su madre por periodos de tres horas diarias durante las dos primeras semanas de vida. En la edad adulta, los animales sometidos a SM muestran un repertorio de patologías similares a las observadas en humanos, como una desregulación del eje HPA⁵, una mayor vulnerabilidad ante nuevos estresores⁶, aumento en la conducta tipo depresiva^{5,7}, hipertensión arterial, una preferencia mayor por la dieta “tipo cafetería”⁸ (dieta apetecible con alto contenido en carbohidratos y grasas) y alteraciones metabólicas moderadas^{9,11}. El aislamiento social a partir del destete es un estresor crónico que aumenta el consumo de alimentos

“apetecibles”¹², la ganancia de peso corporal y la vulnerabilidad a la dieta obesogénica¹³. Se ha observado que la SM aumenta el efecto del aislamiento social sobre el consumo de alimentos “apetecibles” y la ganancia de peso corporal; e incluso se ha propuesto como un modelo animal de trastornos alimenticios relacionados con el estrés¹⁴; no obstante la interacción entre la SM y el aislamiento social sobre marcadores de vulnerabilidad metabólica y su relación con la reactividad al estrés no se ha evaluado.

MARCO TEÓRICO

EL ESTRÉS

El estrés es un mecanismo de alarma que nos permite reaccionar ante una amenaza. Este concepto fue empleado por primera vez en un contexto científico en 1911, por Walter Cannon; quien, descubrió accidentalmente la influencia de factores emocionales sobre la secreción de adrenalina¹⁵. Cannon desarrolló el concepto de “enfrentamiento o huida” a partir de sus observaciones sobre la liberación de catecolaminas por la médula suprarrenal y las terminaciones nerviosas simpáticas. Sin embargo, no fue sino hasta 1934, que Hans Selye definió por primera vez el concepto de estrés como: “Una respuesta no específica del organismo ante cualquier demanda”¹⁶. Actualmente contamos con una definición más amplia en la que el estrés es considerado una “serie de respuestas fisiológicas, como la activación del eje HPA o el sistema simpático -adrenal, y conductuales, como la ansiedad o la ira, que se activan en respuesta a una amenaza a la homeostasis del organismo”¹⁷. Mientras que la respuesta a un episodio de estrés puede ayudar a aumentar la probabilidad de supervivencia del individuo, la exposición repetida al estrés está relacionada con la aparición de una gran variedad de patologías^{18,19}; por lo que de acuerdo al tiempo de duración de la exposición, el estrés puede ser clasificado como:

Estrés agudo. Es una reacción fisiológico necesaria frente a una situación de peligro a corto plazo o momentánea.

Estrés crónico. Provoca la desmotivación, agotamiento, ansiedad y depresión a largo plazo debido a experiencias adversas

El estrés crónico es un concepto más próximo al de tensión o sobrecarga que al de cambio o acontecimiento, y fue definido por Wheaton (1997) como "El conjunto de amenazas, exigencias, constricciones o limitaciones estructurales que, por el mero hecho de su presencia, ponen en cuestión la integridad operativa del organismo"¹.

LA RESPUESTA AL ESTRÉS

El eje HPA es el eje neuroendocrino característico de la respuesta al estrés²⁰. Cuando se detecta una amenaza, ya sea real o percibida se activan vías del sistema nervioso central (SNC) que convergen en el hipotálamo. Allí se activa la liberación de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) del núcleo paraventricular (PVN) hacia la circulación portal hipofisiaria e induce la secreción de la hormona adrenocorticotropa (ACTH) en la hipófisis. Esta hormona viaja hasta la corteza de las glándulas suprarrenales, donde estimula la secreción de glucocorticoides. El principal efector de la respuesta al estrés es el cortisol en humanos, mientras que su homólogo en ratas es la corticosterona (Fig. 1).

Todos estos cambios preparan al organismo para actuar ante la situación estresante (reacción de “enfrentamiento o huida”) al mismo tiempo que interrumpen otros procesos que no son necesarios para sobrevivir la emergencia. El aumento de la actividad del eje HPA induce supresión del sistema inmune y un aumento de la capacidad energética. Si bien una estimulación a corto plazo de este eje neuroendocrino puede producir euforia e incremento de la energía, la activación crónica del mismo se relaciona con diferentes patologías, como la obesidad, problemas cardiovasculares y desórdenes del afecto como la depresión y la ansiedad^{18,19}.

El hipocampo, junto con el hipotálamo y la corteza prefrontal son estructuras cerebrales que participan en los mecanismos de retroalimentación negativa del eje HPA (Fig. 1). Adicionalmente, estas estructuras se encuentran involucradas en el control del estado de ánimo y la psicopatología de la depresión. El aumento prolongado en los niveles de GC, como el que tiene lugar durante la activación del eje HPA, puede ser tóxico para las neuronas del hipocampo, provocar atrofia dendrítica e incluso muerte celular²¹. Por esto se ha propuesto que la liberación prolongada de GC puede predisponer a depresión recurrente y causar alteraciones en la retroalimentación negativa del eje HPA²⁰.

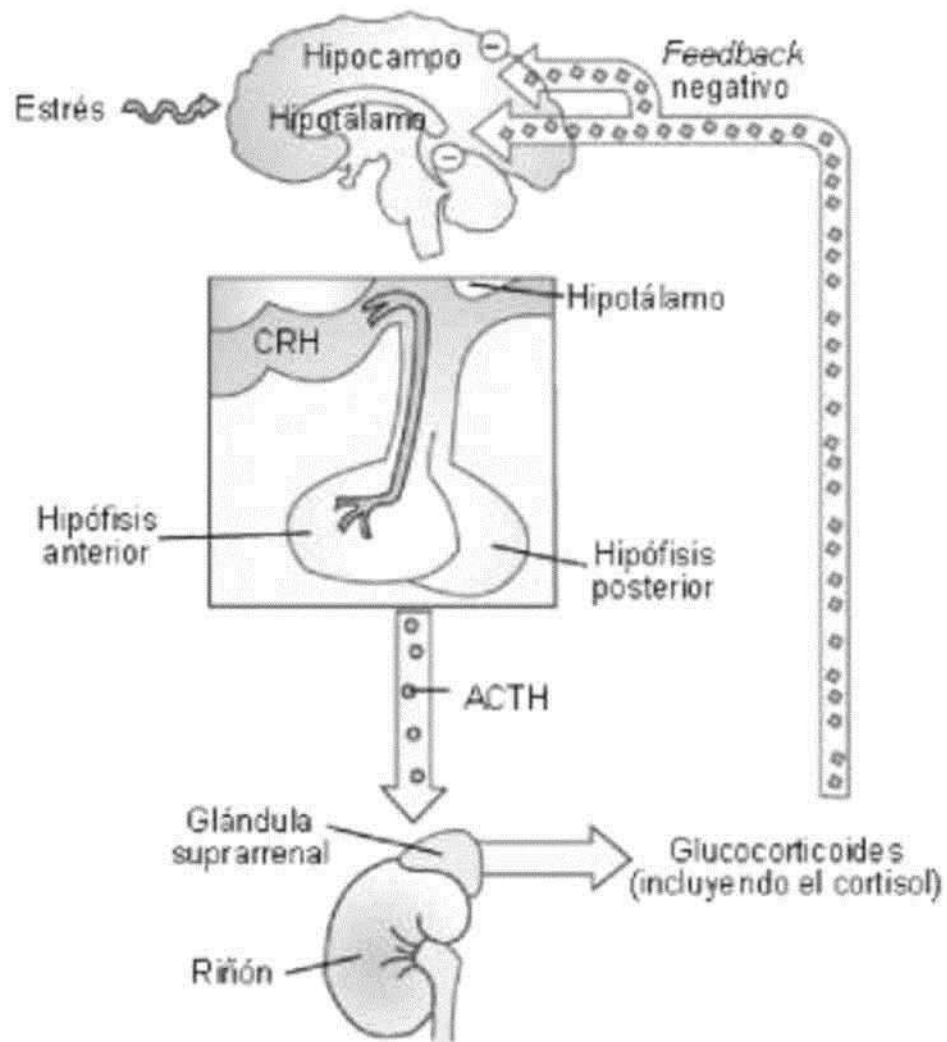


Figura 1: Esquema de los principales componentes del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y de los mecanismos de la retroalimentación negativa (Tomado de Marquez, 2012²⁰).

CARGA ALOSTÁTICA

A corto plazo, la activación de la respuesta al estrés facilita la supervivencia ante una situación amenazante, y por lo tanto puede considerarse como un proceso adaptativo; sin embargo, si la recuperación del estrés agudo no va sugerida de regreso a la homeostasis, ocurrirán efectos psicológicos y físicos permanentes llamados carga alostática²². Se define como respuesta alostática a las adaptaciones en los sistemas fisiológicos inducidas por el estrés^{18,23,24}. La exposición crónica o persistente al estrés causa una activación continua y repetida de estos sistemas a lo largo del tiempo. El costo energético de esta “sobreactivación” se ha denominado carga alostática. Este concepto se refiere a la desorganización de los sistemas biológicos involucrados en la respuesta al estrés y se relaciona con el desarrollo de un gran repertorio de patologías (Fig. 2) como enfermedades mentales, cardiovasculares, inflamatorias y metabólicas^{18,25}. Por ejemplo: de forma aguda, la respuesta alostática, causa un aumento en las concentraciones de energía, es decir glucosa en sangre, necesaria para responder ante una amenaza; sin embargo, de forma crónica causa un aumento excesivo de la secreción de insulina y una mayor vulnerabilidad al síndrome metabólico y a la diabetes tipo II. De la misma forma, durante la respuesta aguda hay un aumento en el estado de vigilancia y excitación; pero, de forma crónica estas modificaciones conductuales pueden llevar a la aparición de desórdenes del afecto y ansiedad¹⁸. En este caso nos hallamos frente a una categoría diagnóstica y ya no frente a una mera reacción adaptativa normal. Cuando la demanda del ambiente resulta excesiva respecto de los recursos de afrontamiento que se disponen, cuando se exceden las posibilidades biológicas del sujeto, entonces se desarrolla una serie de reacciones que implican una sobreactivación fisiológica a fin de lograr justamente un incremento en la fuerza y recursos que permite ajustarse a las demandas. Se trata de una reacción exagerada ante demandas también exageradas. Por lo tanto, la exposición al estrés

crónico traerá aparejado un conjunto de reacciones emocionales negativas (desagradables) entre las cuáles sobresalen la ansiedad, el enojo y la tristeza²⁶.

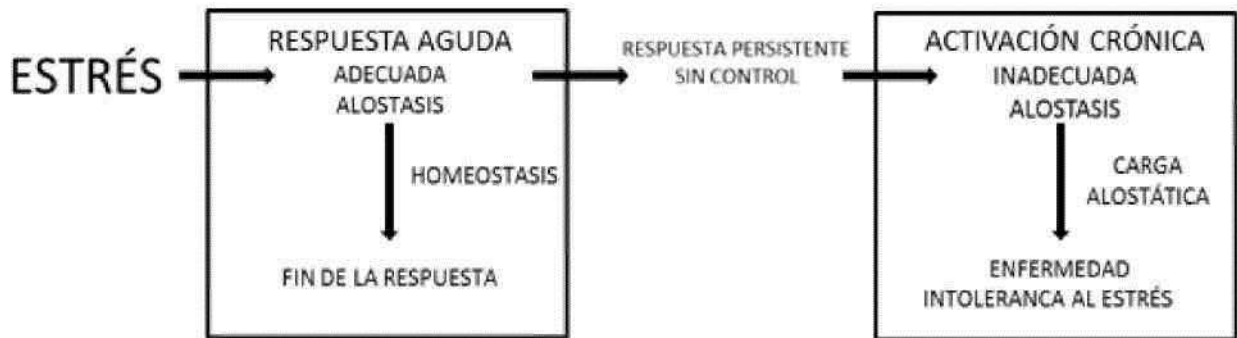


Figura 2: Relación entre homeostasis y carga alostática (Tomada de Azcárate Mengual, 2007²²).

Desde un punto de vista evolutivo, las emociones tienen una función adaptativa que hace que el organismo pueda afrontar cambios ambientales. De hecho, la ansiedad y el enojo suelen ser emociones “activadoras”, vale decir, provocarían un aumento del ritmo cardíaco y respiratorio otorgando más fuerza a un sujeto ya sea para defenderse, atacar o huir de un peligro. La tristeza, en cambio, constituye una emoción “desactivadora” ya que dispara los procesos antagónicos a las anteriores. Por eso en la primera fase del estrés aparecen la ansiedad y la ira en tanto que en una segunda fase aparece la depresión como emoción preponderante. El estrés crónico puede ser definido entonces como un proceso que se dispara ante demandas ambientales que superan la capacidad de respuesta del individuo¹.

SÍNDROME METABÓLICO Y DIABETES MELLITUS

Se considera que un individuo tiene una mayor “*vulnerabilidad metabólica*” cuando se presenta obesidad de distribución central, disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (cHDL), elevación de las concentraciones de triglicéridos, aumento de la presión arterial (PA) e hiperglucemia. A este conjunto de alteraciones se le ha denominado síndrome metabólico. El síndrome metabólico es uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI y se asocia a un incremento en la prevalencia de diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular²⁷.

El síndrome metabólico no es una enfermedad nueva; su descripción tuvo lugar hace al menos 80 años (en la década de los años veinte) por parte de Eskyl Kylin, un médico sueco que definió la asociación entre la hipertensión, hiperglucemia y gota.

En 1947, Vague publicó un artículo ya clásico en el que se llamaba la atención sobre el hecho de que el fenotipo de obesidad con acumulación excesiva de tejido adiposo en la parte superior del cuerpo (obesidad de tipo androide o masculino) se asociaba con las alteraciones metabólicas que se observaban en la diabetes tipo 2 y la enfermedad cardiovascular (ECV). Veinte años después, Avogadro y colaboradores documentaron la aparición simultánea de obesidad, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensión. La importancia clínica del síndrome metabólico fue destacada de nuevo 20 años después por Reaven que describió la presencia de un conjunto de alteraciones metabólicas cuyo rasgo fisiopatológico central era la resistencia a la insulina. Reaven denominó a este cuadro «síndrome X» pero, de manera sorprendente, no incluyó la obesidad en él; sin embargo, la obesidad se ha insertado en el concepto de síndrome metabólico en todas las definiciones posteriores²⁸.

Desde la primera definición oficial del síndrome metabólico realizada por el Grupo de Trabajo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1999, se han propuesto diversas definiciones alternativas. Las más aceptadas han sido las elaboradas por el European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) y por el Adult Treatment Panel III (ATP-III) del National Cholesterol Education Program (NCEP, Tabla 1).

La diabetes mellitus (DM), es una enfermedad crónica causada por la incapacidad para

producir insulina o de utilizarla de manera eficaz. La insulina es una hormona producida por las células β de los islotes de Langerhans en el páncreas, que permite el ingreso de la glucosa de la sangre hacia las células para producir energía. Esta incapacidad conduce a niveles elevados de glucosa en sangre (hiperglucemia). Los altos niveles de glucosa durante un período de tiempo prolongado se asocian con daño en varios órganos y tejidos²⁹

Tabla 1: Definiciones de síndrome metabólico propuestas por la OMS, el EGIR y la ATP (tomado de Zimmet y cols.).

OMS, 1999	EGIR, 1999	ATP-III, 2001
Diabetes o alteración de la tolerancia a la glucosa o resistencia frente a la insulina ^a	Resistencia a la insulina ^a o hiperinsulinemia (únicamente a las personas no diabéticas)	
Más dos o más de los factores siguientes	Más dos o más de los factores siguientes	Tres o más de los factores siguientes
1. Obesidad: IMC > 30 o CCC $> 0,9$ en los varones o $> 0,85$ en las mujeres	1. Obesidad central: PC ≥ 94 cm en los varones o > 80 cm en las mujeres	1. Obesidad central: PC > 102 cm en los varones o > 88 cm en las mujeres
2. Dislipemia: triglicéridos $> 1,7$ mmol/l o cHDL $< 0,9$ en los varones o $< 1,0$ en las mujeres	2. Dislipemia: triglicéridos $> 2,0$ mmol/l o cHDL $< 1,0$	2. Hipertrigliceridemia: triglicéridos $> 1,7$ mmol/l
3. Hipertensión: presión arterial $\geq 140/90$ mmHg o tratamiento medicamentoso	3. Hipertensión: presión arterial $\geq 140/90$ mmHg, tratamiento medicamentoso o ambos	3. Disminución del cHDL: $< 1,0$ mmol/l en los varones o $< 1,3$ mmol/l en las mujeres
4. Microalbuminuria: excreción de albúmina ≥ 20 μ g/min	4. Glucemia en ayunas $> 6,1$ mmol/l	4. Hipertensión: presión arterial $\geq 130/85$ mmHg o tratamiento medicamentoso
		5. Glucemia en ayunas $\geq 6,1$ mmol/l

OMS: Organización Mundial de la Salud; EGIR: European Group for the Study of Insulin Resistance; ATP-III: Adult Treatment Panel III; IMC: índice de masa corporal; CCC: cociente entre el perímetro de la cintura y el perímetro de la cadera; PC: perímetro de la cintura; cHDL: colesterol unido a lipoproteínas de alta densidad.

^aDefinida como el cuartil superior de la concentración de insulina en ayunas en personas no diabéticas.

La concentración de glucosa en ayuno mayor a 6.1mmol/l se considera un marcador de síndrome metabólico de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), que

aparece cuando el páncreas no produce insulina suficiente o cuando el organismo no utiliza eficazmente la insulina que produce. Dicha organización estima que existen más de 300 millones de personas afectadas³⁰.

Existen tres tipos principales de diabetes³⁰:

Diabetes tipo 1 (DMT1). Es causada por una reacción autoinmune hacia las células de los islotes de Langerhans.

Diabetes tipo 2 (DMT2). Representa cerca del 90% de todos los casos de diabetes. Se caracteriza por una resistencia a la insulina, una relativa deficiencia de insulina o por ambas cosas a la vez. Se encuentra asociada con el sobrepeso o la obesidad y otros componentes del síndrome metabólico, los cuales conducen a altos niveles de glucosa en sangre.

La diabetes gestacional (DMG). Consiste en altos niveles de glucosa en sangre durante el embarazo y generalmente desaparece después del parto, aunque tanto las mujeres con DMG, como sus hijos presentan un riesgo mayor de desarrollar diabetes tipo 2 más adelante en la vida³¹.

Existen además clasificaciones específicas de diabetes.

- Diabetes tipo I
- Diabetes tipo II
- Diabetes tipo III Gestacional-cambio hormonal
- Diabetes tipo IV Secundaria, síndrome de Cushing (hipercortisolemia), acromegalia, enfermedad pancreática, etc.

Mecanismos metabólicos y hormonas que controlan la concentración de glucosa en sangre:

Insulina: hormona secretada por el páncreas que interviene activamente en el

metabolismo de hidratos de carbono y se encarga de disminuir las concentraciones de glucosa en sangre. Adicionalmente, la insulina favorece la formación de glucógeno, grasas y proteínas en el tejido hepático, muscular y adiposo. La disminución de los niveles de glucosa en sangre causa una inhibición de la secreción de insulina.

- ❖ La vida media de la insulina es alrededor de 5min en el humano, casi todos los tejidos tienen la capacidad de metabolizar la insulina, pero el 80% de la insulina secretada es normalmente degradada en el hígado y los riñones.
- ❖ La insulina se une a los órganos diana; hígado, músculo y tejido adiposo específicamente a los receptores GLUT-4 y GLUT-2. El transporte de glucosa mediado por GLUT-4 en el músculo y tejido adiposo es dependiente de insulina.
- ❖ En la mayoría de los tejidos no hepáticos, la insulina aumenta el ingreso de la glucosa incrementando el número de transportadores de glucosa en la membrana celular

Glucagón: responde a los niveles bajos de glucosa sanguínea, produce un aumento rápido de glucosa, actúa estimulando la glucogenólisis y la gluconeogénesis en el hígado, pero no en músculo.

Adrenalina: es secretada por el sistema simpático adrenal en respuesta al estrés. Eleva el nivel de glucosa en sangre estimulando la glucogenólisis. Provoca aumento inmediato en la producción de glucosa para obtener energía junto con aumento en la frecuencia cardíaca y presión arterial³¹.

RELACIÓN ENTRE EL ESTRÉS, LA DEPRESIÓN Y EL SÍNDROME METABÓLICO

El hilo común entre el estrés crónico, la depresión y el síndrome metabólico es la secreción excesiva y/o inadecuada de GC, estas entidades establecen entre sí relaciones multidireccionales, que ilustran lo complejo de los organismos y de su relación con el

medio³².

La secreción excesiva y sostenida de GC, como la causada por la exposición crónica al estrés, se ha asociado desde hace tiempo con una mayor vulnerabilidad a la depresión, hipertensión arterial y síndrome metabólico. Estas manifestaciones podrían, ser causadas por una desregulación del eje HPA, ya sea en condiciones basales o en respuesta al estrés²; aunque también se ha propuesto que, aun cuando la actividad del eje HPA no se encuentra alterada, podría existir una hipersensibilidad específica de los tejidos blancos a GC, como el SNC, el sistema cardiovascular, el sistema inmune o el tejido adiposo³². Se ha observado que existen marcadas similitudes bioquímicas, fisiológicas y clínicas entre los efectos de la exposición al estrés crónico y la depresión mayor. Ambas condiciones se encuentran asociadas a una hiperactividad del eje HPA, caracterizada por un aumento en la secreción de CRH, GC y catecolaminas. Así mismo, se ha mostrado que en ambas condiciones se observa una inhibición de los ejes de la hormona de crecimiento (GH/IGH-1), el eje reproductivo (LH/testosterona-estradiol), y el eje tiroideo (TSH/T3), supresión de la actividad del sistema inmune y cantidades elevadas de interleucina-6³³

Por otra parte, la exposición crónica a niveles elevados de GC se correlaciona con el desarrollo de obesidad central, hipertensión arterial, resistencia a la insulina, alteraciones del perfil lipídico e hipercoagulabilidad. Así mismo, se ha observado una mayor mortalidad por causas cardiovasculares en los pacientes con sintomatología depresiva.³³ Desde el punto de vista metabólico, los GC pueden aumentar la actividad de las enzimas involucradas en la vía de síntesis de los ácidos grasos y promover la secreción de lipoproteínas, inducir la vía de la gluconeogénesis hepática y promover la diferenciación de pre-adipocitos hacia adipocitos, causando así, un aumento de la masa del tejido adiposo. Los GC también pueden inhibir en el transporte de aminoácidos inducido por insulina en los adipocitos e incrementar la lipólisis y la oxidación de lípidos; lo cual, puede ocasionar resistencia a la insulina³⁴. Se ha observado que existe una correlación positiva entre la tasa de liberación/eliminación de GC y la presión arterial sistólica, la concentración de glucosa en ayuno y la concentración de insulina³⁵. En conjunto, estas alteraciones hormonales también pueden ocasionar obesidad visceral, dislipidemia, hipertensión y DMT2³⁶. Adicionalmente, los GC son moduladores importantes de la función del sistema

inmune y del estado inflamatorio, por lo que la exposición crónica al estrés puede causar un estado pro-inflamatorio que aumenta la incidencia de componentes del síndrome metabólico³⁷.

EXPOSICIÓN AL ESTRÉS DURANTE LAS ETAPAS TEMPRANAS DE LA VIDA

En el adulto, los efectos de la exposición al estrés crónico son reversibles una vez que se elimina el factor estresante; sin embargo, durante la infancia la respuesta al estrés exhibe una trayectoria diferencial a lo largo del desarrollo y sus consecuencias son permanentes; por lo que, la exposición a el estrés durante las etapas tempranas de la vida (early life stress, ELS), ya sea en útero o durante la vida postnatal temprana, tiene una participación importante en la susceptibilidad a enfermedades, tanto físicas como mentales, que pueden manifestarse años e incluso décadas más tarde².

Las experiencias tempranas en la vida programan patrones duraderos de respuesta adaptativa al entorno biológico, psicológico y social. La exposición al estrés crónico desde el período prenatal y post natal temprano, produce consecuencias adversas a mediano y largo plazo sobre un número importante de órganos y sistemas vitales para la supervivencia y adaptación exitosa.

Durante el desarrollo los individuos tienen la capacidad de configurarse de distintas maneras posibles de acuerdo al particular medio ambiente con el que interactúan, a este fenómeno se le denomina plasticidad fenotípica. La hipótesis de la programación durante el desarrollo establece que una agresión *in útero* sería capaz de producir una programación anormal de diversos sistemas que se manifestaría a lo largo de toda la vida del individuo³⁸. De tal forma que, si un estímulo o agresión sucediera durante los periodos o “ventanas” críticas del desarrollo, producirá un cambio permanente en el fenotipo del organismo³⁹. La exposición al ELS puede tener consecuencias psicológicas y neurológicas irreversibles y se correlaciona con una mayor probabilidad de padecer patologías relacionadas con el estrés como la depresión, la ansiedad y el síndrome metabólico^{2,3}. Se ha propuesto que el consumo de alimentos reconfortantes es un mecanismo compensador en individuos que han vivido experiencias traumáticas o que viven en ambientes hostiles y que tienen

deficiencias afectivas. Por otra parte, se ha observado que cerca del 80% de los adultos jóvenes que había sufrido maltrato cumplía con al menos un trastorno psiquiátrico a la edad de 21 años; entre los padecimientos identificados había: depresión, ansiedad, trastornos de la conducta alimentaria e intentos de suicidio.^{40,41} Otras condiciones psicológicas y emocionales identificadas fueron trastornos por déficit de atención e hiperactividad y trastorno por estrés postraumático.⁴²

Se ha planteado también la hipótesis de que comer en forma compulsiva puede ser una variable mediadora entre el abuso sexual y la obesidad. El antecedente de experiencias traumáticas, particularmente el abuso sexual durante la niñez, se ha relacionado con conductas impulsivas en los trastornos de la alimentación⁴³. Por ejemplo, en niños adolescentes obesos se observó que alrededor del 36% de ellos (de ambos sexos) come en forma compulsiva y tiene baja autoestima⁴⁴ mientras que en mujeres que padecen bulimia o son comedoras compulsivas se ha observado un índice mayor de antecedente de abuso sexual y maltrato físico⁴⁵.

La depresión en niños y adolescentes es otro problema psiquiátrico relacionado con la obesidad de los adultos y una consecuencia común del maltrato. Un estudio con seguimiento de 1,037 pacientes desde su nacimiento hasta los 30 años de edad, mostró que el 7% de los niños entre los 11 y los 15 años de edad y el 27% en la adolescencia tardía, sufren depresión mayor. A los 26 años el 12% padecía obesidad y la depresión aumentó dos veces el riesgo de este problema de nutrición⁴⁶.

Adicionalmente, se ha planteado que la obesidad es un mecanismo de adaptación. Algunas mujeres que sufrieron abuso sexual pueden volverse obesas como una forma de protección contra el acoso sexual de parejas potenciales no deseadas o de agresores. Para algunas mujeres con antecedentes de abuso sexual la reducción de peso puede dar síntomas de estrés postraumático conforme se aproximan al peso corporal que tenían cuando sufrieron abuso⁴⁷.

MODELO ANIMAL

Los modelos animales reproducen características fisiopatológicas o sufren enfermedades similares a las que presentan los seres humanos. Estos permiten realizar comparaciones entre la fisiología de los modelos y la humana, y contribuyen a que comprendamos cómo funciona el cuerpo humano. La biología comparativa estudia las diferencias y similitudes entre especies, permitiendo realizar predicciones y extrapolar conceptos de una especie a otra.

Los modelos pueden ser espontáneos, cuando un animal tiene características naturales como las de los humanos o una enfermedad humana, o inducidos, cuando el animal se ha alterado, por ejemplo, mediante una cirugía o manipulación genética. Los modelos espontáneos muestran cómo algunos factores, como la dieta, la genética, el medio ambiente y la inmunidad, pueden contribuir a una enfermedad. Los modelos inducidos son útiles para estudiar las causas subyacentes de una enfermedad y son una herramienta de investigación común para la identificación de potenciales objetivos de los fármacos⁴⁸. Los modelos de ELS en roedores cada vez son más comunes en la ciencia, estos ayudan a determinar patologías similares a las que presenta el ser humano. Algunos interfieren con el ambiente prenatal, ya sea estresando a la hembra embarazada o exponiéndola a altos niveles de GC; sin embargo, la mayoría de los modelos se enfocan en el periodo postnatal. La separación maternal (SM) en roedores es el modelo de ELS postnatal más utilizado, ésta consiste en separar a las crías de su madre por periodos de 3 horas diarias durante las dos primeras semanas de vida. Las camadas se mantienen en un cuarto independiente a la colonia, con luz y temperatura controlada, mientras que los animales control permanecen con la madre hasta el día del destete. En la edad adulta, los animales sometidos a SM muestran un repertorio de patologías similares a las observadas en humanos, como desregulación del eje HPA^{5,10}, mayor vulnerabilidad a nuevos estresores⁶, aumento en la conducta tipo depresiva^{5,7}, hipertensión⁴⁹, mayor preferencia por la dieta tipo cafetería⁸ y alteraciones metabólicas moderadas^{9,10,50}. Por otra parte, se ha observado que los animales SM muestran una disminución en la actividad serotoninérgica en el hipocampo y los núcleos del rafe¹⁴.

El aislamiento social a partir del destete (AISL) es un estresor crónico que aumenta el

consumo de alimentos “apetecibles”¹², la ganancia de peso corporal y la vulnerabilidad a la dieta obesogénica¹². Adicionalmente, se ha observado que este estresor crónico aumenta la probabilidad de evidenciar trastornos neuropsiquiátricos; tales como: agresión y rechazo al alimento (neofobia), además de causar una reducción en el volumen cortical prefrontal y disminución de la plasticidad sináptica⁵¹

ANTECEDENTES

En 2009 Ryu y colaboradores observaron que el aislamiento social después del destete causa incremento en el peso corporal e hiperfagia en animales que experimentaron SM; sin embargo estos autores observaron que ni la SM ni el aislamiento social por si solos aumentaron estos parámetros. Adicionalmente reportaron que los animales SM mostraban un aumento en la conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado y un aumento en la conducta de ansiedad de forma independiente al aislamiento. Debido a lo anterior, los autores proponen que el aislamiento social promueve la hiperfagia y la ganancia de peso corporal en los animales que sufrieron SM, probablemente debido al impacto sobre la conducta “psico-emocional”⁵². Posteriormente, Jahng (2011) continuó con estos estudios y observó que los animales con SM muestran hiperfagia sostenida cuando se les expone a ciclos repetidos de ayuno/alimentación, la cual se acompañó de un aumento en los niveles de corticosterona, anhedonia ante la comida apetecible y alteraciones en la respuesta dopaminérgica mesolímbica ante el estrés¹⁴. Por todo esto, Jahng propuso que la SM puede ocasionar la aparición de desórdenes alimenticios cuando es enfrentada con estresores sociales, como el aislamiento, o metabólicos, como los ciclos de ayuno/alimentación, e incluso la propone como un modelo animal de trastornos alimenticios relacionados con el estrés¹⁴.

Dado que, la SM y el aislamiento social podrían tener efectos sinérgicos sobre la vulnerabilidad metabólica y la conducta alimenticia en el presente trabajo evaluaremos la interacción entre la SM y el aislamiento social sobre la tolerancia a la glucosa, la glicemia en ayuno y la química sanguínea y su relación con la reactividad al estrés.

HIPÓTESIS

La separación maternal aumenta el efecto del aislamiento social sobre la respuesta al estrés y su **relación** con la vulnerabilidad metabólica.

OBJETIVOS

GENERAL

Evaluar el efecto de la SM y el aislamiento social sobre la respuesta al estrés y su relación con la vulnerabilidad metabólica.

PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la separación maternal, el aislamiento social y la combinación de ambos sobre la respuesta al estrés.
2. Evaluar el efecto de la separación maternal, aislamiento social y la combinación de ambos sobre la vulnerabilidad metabólica.

METODOLOGÍA Y MATERIALES

Se utilizaron ratas macho adulto de 60 días de edad de la cepa Sprague Dawley en condiciones control y sometidas a separación maternal (día P1-14), aislamiento social desde destete o ambos. Al momento de la SM las camadas se mantuvieron en cajas de acrílico con aproximadamente 2 cm de aserrín, en un cuarto independiente a la colonia, con luz y temperatura controlada. En cuanto a los animales control, estos permanecieron con la madre hasta el día del destete, sin alterarlas, con excepción de la rutina de limpieza de cajas realizada cada tercer día. El día del nacimiento se designó como día postnatal (P) cero, al día P1 se determinó el sexo de las crías ajustando a 8 ratas por camada (seis machos y dos hembras) con el fin de que no compitan por el alimento de la madre. Se utilizaron únicamente machos para evitar las variaciones debidas al ciclo estral. Los animales se destetaron al día P21 y se dejaron crecer hasta la edad adulta (día P60). La mitad de los machos de cada camada se asignó al protocolo de aislamiento social y se mantuvieron en cajas individuales hasta su evaluación. El resto de los animales se mantuvieron en grupos de 2-3 hermanos provenientes de la misma camada. Todos se mantuvieron en el mismo cuarto a temperatura y luz controlada (12/12) y alimentación *ad libitum* con croqueta comercial (LabDiet 5008/5001). Al día P60 los animales se sometieron a la prueba de nado forzado y se les implantó un catéter en la vena yugular; se dejaron recuperar por una semana para evaluar la tolerancia a la glucosa y la reactividad al estrés (Fig 3).

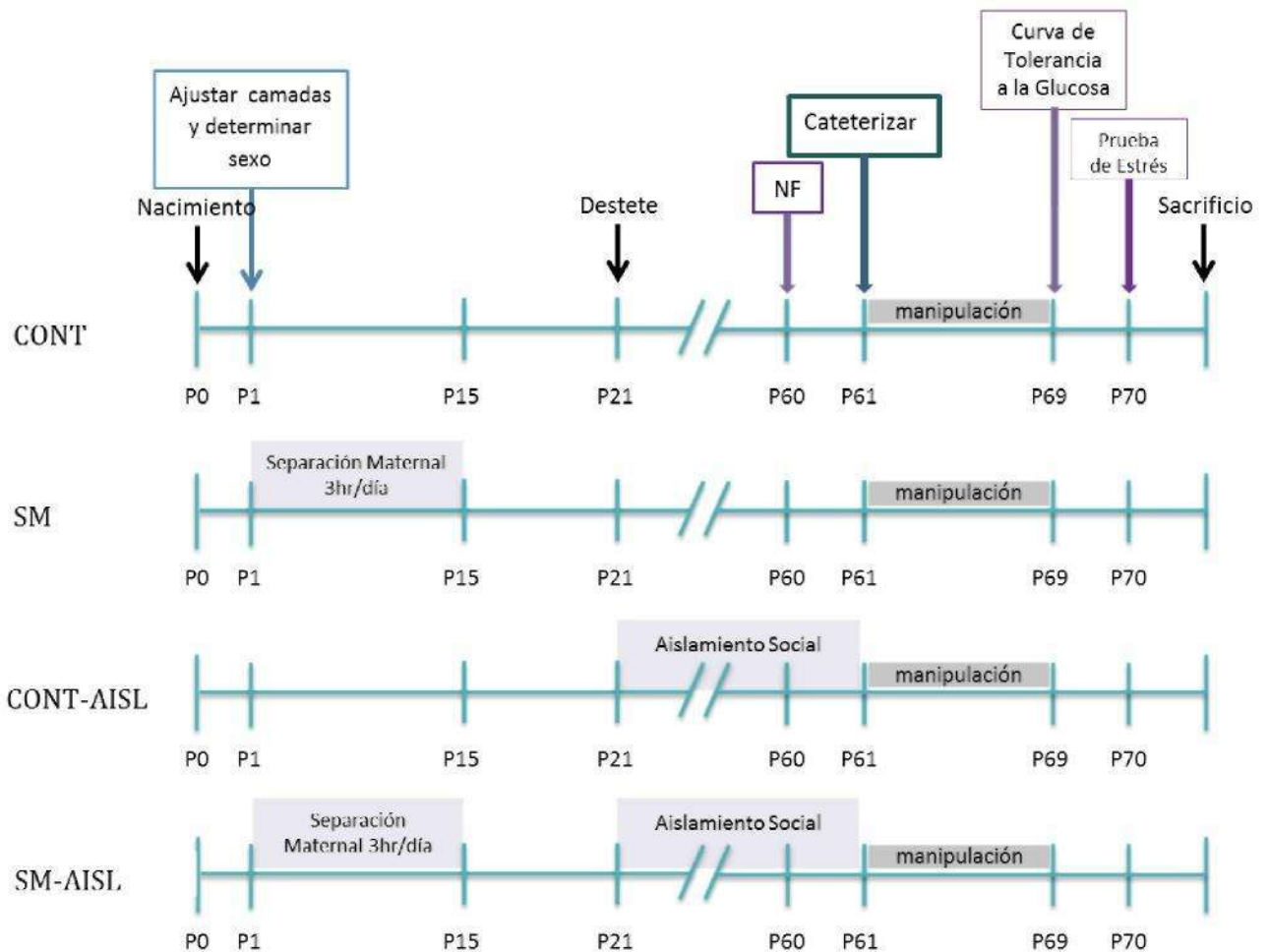


Figura 3: Estrategia experimental.

Las técnicas de eutanasia, anestesia, el cuidado y tratamiento aplicados a los animales se apegaron estrictamente a la norma oficial de uso y cuidado de animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) así como las convenciones internacionales para el manejo de animales de laboratorio (NIH, EU.). Asimismo nos apegamos a las normas y reglamentos institucionales (Norma que establece las disposiciones para la investigación en salud en el Instituto Mexicano del Seguro Social), y a los criterios de la Ley General de Salud (Última Reforma

DOF 25-01-2013). Todo esto prestando particular atención en disminuir el sufrimiento de los animales al mínimo así como cuidar la cantidad de animales utilizada para cada experimento. Los protocolos de estrés psicosocial aquí propuesto son considerados estresores crónicos pero moderados, que no causan sufrimiento ni dolor a los animales. El presente trabajo se realizó dentro del marco del protocolo de investigación titulado: "Efecto del aumento de la prolactina en la leche materna sobre las alteraciones neuroendocrinas causadas por la exposición al estrés durante el desarrollo y los factores de riesgo de síndrome metabólico" aprobado por el comité local de ética en la investigación (IMSS) con número de registro: R-2010-1602-35.

Prueba de Nado Forzado

Se evaluó la conducta tipo depresiva en la prueba de nado forzado, por un tiempo de 10 minutos. Para esto se utilizó un cilindro de acrílico transparente de 30 cm de diámetro y 50 cm de altura, el cual se llenó con agua a los 40 cm a 21 °C. El comportamiento se registró con ayuda de un programa de cómputo de manufactura casera (EVENTLOG). El objetivo de esta prueba es determinar la conducta pasiva o activa de los animales evaluando el tiempo que los animales ejecutan los siguientes parámetros: pataleo (romper activamente el plano del agua), nado (mover activamente alguna de las extremidades), flotación (permanecer inmóviles con las cuatro extremidades sin movimiento) y por último la latencia al flotar. Al término de la prueba, se secó a los animales perfectamente y se regresaron a su caja.

Implante de Catéter

A los 60 días de edad (P60), a todos los animales se les implantó un catéter en la vena yugular, para la recolección de muestras sanguíneas. Para esto, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (50 mg/ml), xilacina (23.3 mg/ml) y solución salina a una dosis de 1ml/kg de peso corporal. Una vez dormido el animal, se limpió y rasuró el área y se hizo una pequeña incisión a la altura de la clavícula. Se disecó la vena yugular derecha, utilizando material estéril y con ayuda de microscopio se insertó un catéter de 17 cm de longitud (13 cm tubería de polietileno 0.58mm DI/0.96 OD y 4.5

(100µl/ml) en NaCl que se aseguró con hilo de seda negro (3-0). El resto del catéter se pasó por debajo de la piel dando salida a la altura de la nuca donde el animal no lo pudiera ver. Los animales se dejaron en recuperación una semana en cajas de aislamiento y se les manipuló diariamente para habituarlos al manejo.

Reactividad al estrés

Los animales se conectaron a una tubería de muestreo de 30 cm de largo llena de solución de heparina y se dejaron estabilizar por una hora y media. Se tomó una muestra sanguínea basal, (400 µl) sustituyendo con el mismo volumen de solución salina estéril, y los animales se sometieron a un estresor por nado (tanque con agua fría) durante 2 min, se tomaron muestras sanguíneas 5, 30 y 60 min posteriores al estrés. Se separó el plasma y las muestras fueron almacenadas a -70°C hasta su procesamiento.

Las muestras sanguíneas fueron depositadas en micro tubos previamente preparados con 5 µl de EDTA (10%) y 10 µl de Aprotinina, posteriormente, centrifugamos (10min/700r.p.m/40 °C), separamos plasma y realizamos 5 alícuotas por muestra de 30 µl cada una. Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento. La concentración de corticosterona en plasma se evaluó mediante el uso de un ensayo comercial de ELISA (Enzo Life Sciences) utilizando el protocolo modificado para muestras pequeñas recomendado por el proveedor.

Curva de tolerancia a la glucosa

Los animales se dejaron en ayuno durante 16 horas previas al experimento, posteriormente se pesaron, conectaron a una tubería de muestreo de 30 cm de largo llena con solución de heparina y se dejaron estabilizar por 1 hora. Se tomó muestra sanguínea basal (400 µl) por medio del catéter, para después administrar glucosa (50% 1ml/kg). Se tomaron muestras sanguíneas a los 15, 30, 60 y 120 min después de la administración de glucosa. Las muestras fueron recolectadas en micro tubos previamente preparados con 5 µl de EDTA (10%) y 10 µl de aprotinina, con el fin de evitar la coagulación, y centrifugados (10min/700r.p.m/40 °C) para separar el plasma.

La concentración de glucosa se evaluó mediante el uso de un glucómetro comercial marca (Roche. Accu-Chek Performa) y el resto de las muestras se almacenaron a -70 °C hasta su procesamiento. Para evaluar el área bajo la curva de tolerancia a la glucosa, las concentraciones de glucosa de cada rata se graficaron con la ayuda de un programa de análisis de datos (Excel) y el área total de la curva de cada rata se evaluó con el sistema analizador de imágenes *Image J*.

Sacrificio

Los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestesia (pentobarbital sódico i.p 0.5ml) y se perfundieron por vía cardiaca con 200ml de solución salina (NaCl 0.9%) y fijador (Paraformaldehído 4% en buffer de fosfatos 0.2M). Para esto, se realizó una incisión en caja torácica evitando cortar el corazón, cortamos la aurícula derecha y se insertó una aguja de venoclisis con solución salina en el ventrículo izquierdo del corazón. Una vez que el cuerpo de la rata quedó libre de sangre insertamos la aguja de la solución fijadora en el mismo sitio. Se disecó y pesó la grasa testicular y los cerebros se almacenaron para análisis posteriores.

Química sanguínea

Después de la recolección de muestras sanguíneas, las cuales se centrifugaron, se separó plasma y se almacenó a -70 °C, posteriormente se realizó un ensayo colorimétrico mediante un kit comercial (Randox) para colesterol y triglicéridos de acuerdo a las recomendaciones del proveedor y utilizando un protocolo modificado para volúmenes pequeños.

Ganancia de peso:

Se evaluó el peso corporal de los animales cada 10 días a partir del día P30 y hasta el día P60 mediante el uso de una balanza comercial para roedores.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con la ayuda del programa análisis de datos GB-STAT y se estableció un nivel de significancia mínimo de $p \leq 0.05$. Se calculó la media y el error estándar de todos los grupos y se realizó una prueba *t de student* para evaluar el efecto de la SM sobre la conducta tipo depresiva (prueba de nado forzado), la reactividad al estrés y la resistencia a la insulina. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos factores (SM vs aislamiento) para determinar el efecto del tratamiento en los diferentes parámetros de la prueba de nado forzado y la química sanguínea. Para evaluar la reactividad al estrés y la tolerancia a la glucosa se utilizó un análisis de varianza de medidas repetidas (SM/aislamiento/tiempo). En los casos en que la ANOVA mostró diferencias significativas se realizó una prueba post-hoc de Fisher-LSD o Newmann-Keuls para las comparaciones múltiples.

RESULTADOS

De acuerdo a lo previamente reportado, observamos que al comparar únicamente a los animales SM con el grupo CONT, en la prueba de nado forzado los machos SM muestran una disminución en el tiempo de escalamiento (*T de Student*: $p = 0.001$), aumento en el tiempo de nado ($p = 0.01$) y de flotación ($p = 0.009$) sin mostrar cambios en la latencia a la primera flotación. La concentración basal de corticosterona fue significativamente mayor en los animales SM respecto a los CONT ($p = 0.01$). Adicionalmente observamos que los animales SM muestran aumento de la glicemia en ayuno ($p = 0.03$), así como 30 y 120 min después de inducir hiperglicemia ($p = 0.01$ y $p = 0.009$ respectivamente) y un aumento en el área bajo la curva de tolerancia a la glucosa ($p = 0.006$); sin embargo estas diferencias no se observan a realizar el análisis de varianza de todos los grupos.

Prueba de nado forzado. Encontramos un efecto significativo sobre las conductas activas en la prueba de nado forzado. Los animales SM y SM-A mostraron una disminución significativa en el tiempo de escalamiento ($F_{1, 44}$: 16.38, $p = .0002$, Fig. 4a), respecto a los grupos CONT-A y CONT. De igual manera hubo aumento significativo en la conducta de nado de los animales SM y SM-A al compararlos con el grupo CONT-A ($F_{1, 44}$: 12.88, $p = .0009$, Fig. 4b). No encontramos efecto del tratamiento sobre las conductas pasivas (flotación Fig. 4c).

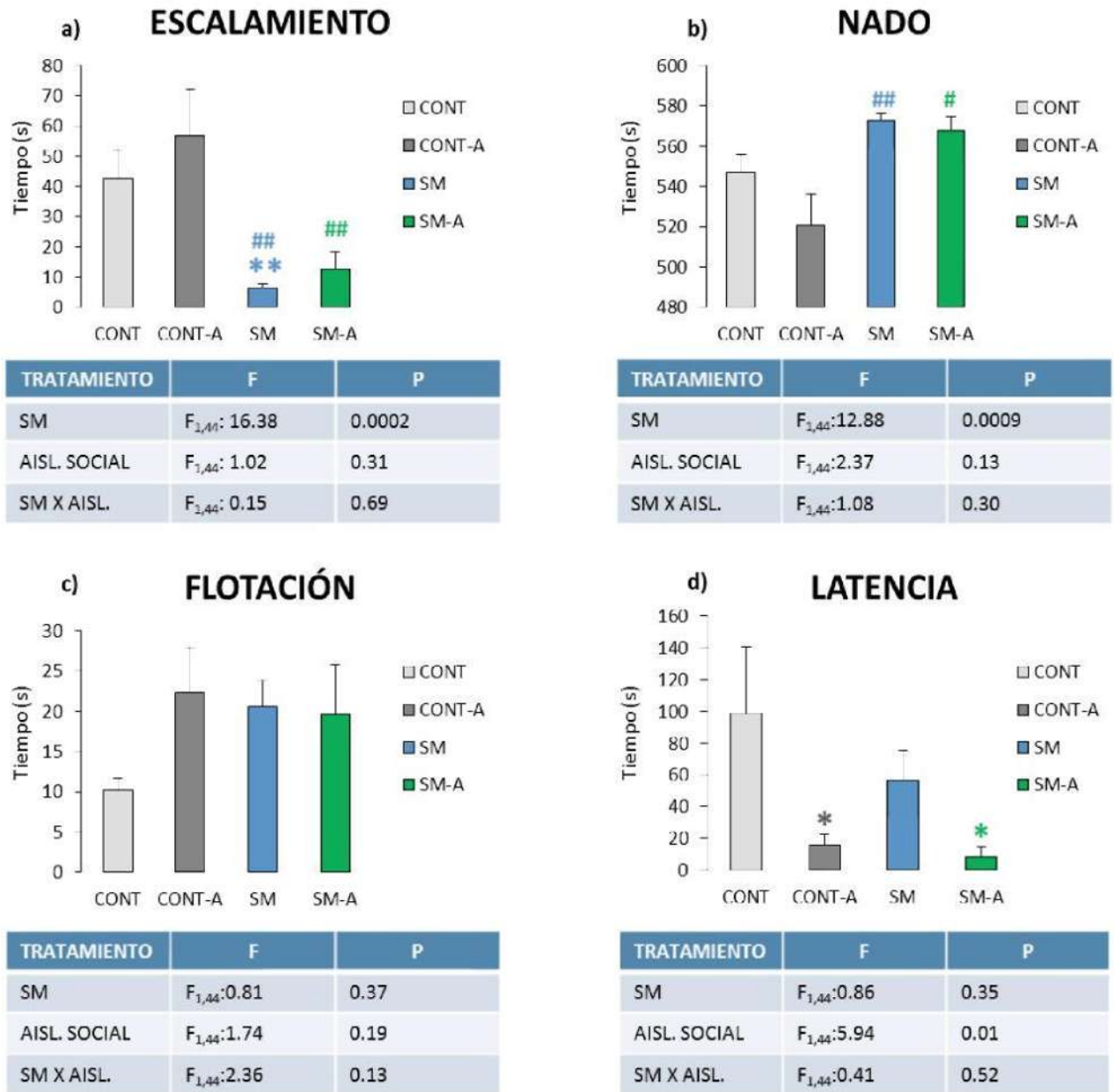


Figura 4. La SM el aislamiento social y su combinación causan una estrategia pasiva en la prueba de nado forzado. Se muestra la conducta de machos adultos control (CONT) y sometidos a separación maternal (SM), aislamiento social en la adolescencia (CONT-A) o ambos (SM-A). **a)** Tiempo de escalamiento, **b)** tiempo de nado, **c)** tiempo de flotación y **d)** latencia a flotar. Tablas con valores estadísticos. ($PROM \pm EST$, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ vs CONT, $\#p \leq 0.05$, $##p \leq 0.05$ vs CONT-A, CONT: $n = 12$, CONT-A: $n = 12$, SM: $n = 14$, SM-A: $n = 7$).

Reactividad al estrés

La exposición al estrés por nado causó un aumento significativo en la concentración de CORT en plasma 15 minutos después de la exposición ($F_{3,147}$: 8.52, $p = 0.0001$, Fig. 5a). Observamos un efecto significativo del AISL ($F_{1,147}$: 6.69, $p = 0.014$, Fig 2a), pero no de la SM ($F_{1,147}$: 3.16, $p = 0.08$, Fig. 5a) sobre la reactividad al estrés. Los animales SM-A mostraron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de CORT al estrés con respecto a los CONT (Fig 5a), el cual se refleja en un mayor porcentaje de aumento con respecto a la basal. ($F_{1,35}$: 7.50, $p = .008$, Fig 2c); adicionalmente, en condiciones basales se observó un aumento significativo de la concentración de CORT en el grupo CONT-A con respecto al CONT ($F_{1, 35}$: .69, $p = .0158$, Fig. 5b).

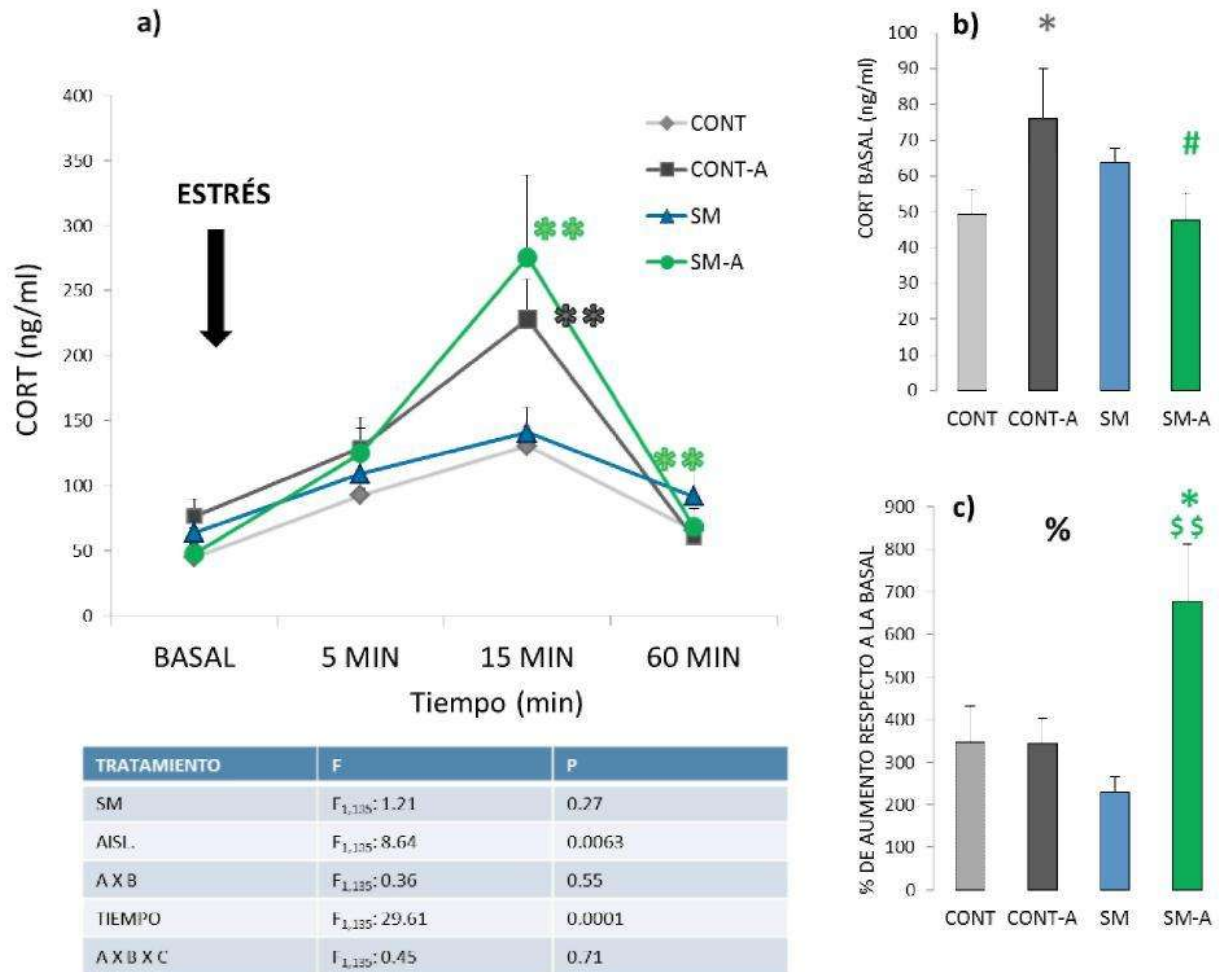


Figura 5. La SM en combinación con el aislamiento social aumenta los niveles de corticosterona. a)

Concentraciones de corticosterona en sangre basal, 5, 15 y 60 min después de un episodio de estrés de los grupos control (CONT, rombos), control aislado (CONT-A, cuadrados), separación maternal (SM, triángulos) y separación maternal aislado (SM-A, círculos). Tabla con valores estadísticos. **b)** Concentración de corticosterona en sangre en muestras basales. **c)** Porcentaje de aumento 15 minutos después con respecto a la basal. ($PROM \pm EST$, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ vs CONT, $^{\$}p \leq 0.05$ vs CONT-A, $^{\#}p \leq 0.01$ vs CONT-A; CONT: $n=8$, CONT-A: $n=8$, SM: $n=9$, SM-A: $n=10$. (ANOVA de medidas repetidas: Factor A: SM, Factor B: AISL, Factor C: Tiempo, AxB: Interacción SMxASL, AxBxC: Interacción SMxAISLxTiempo)

Curva de tolerancia a la glucosa

Observamos aumento en la concentración de glucosa en sangre 15 y 30 minutos después de la hiperglicemia ($F_{1,189}$: 38.70, $p = 0.0001$. Fig. 6a). Todos los grupos excepto SM restauraron sus niveles de glucosa al cabo de 120 min ($p \leq 0.01$ Fig. 6a). Por otro lado, la concentración de glucosa en ayuno del grupo SM-A fue significativamente mayor que en los animales CONT y CONT-A ($F_{1, 34}$: 8.95, $p = 0.03159$, Fig. 6b); sin embargo no observamos diferencias significativas en el área bajo la curva de tolerancia a la glucosa ($F_{1, 34}$: 5.04 $p = 0.6101$, Fig. 6c).

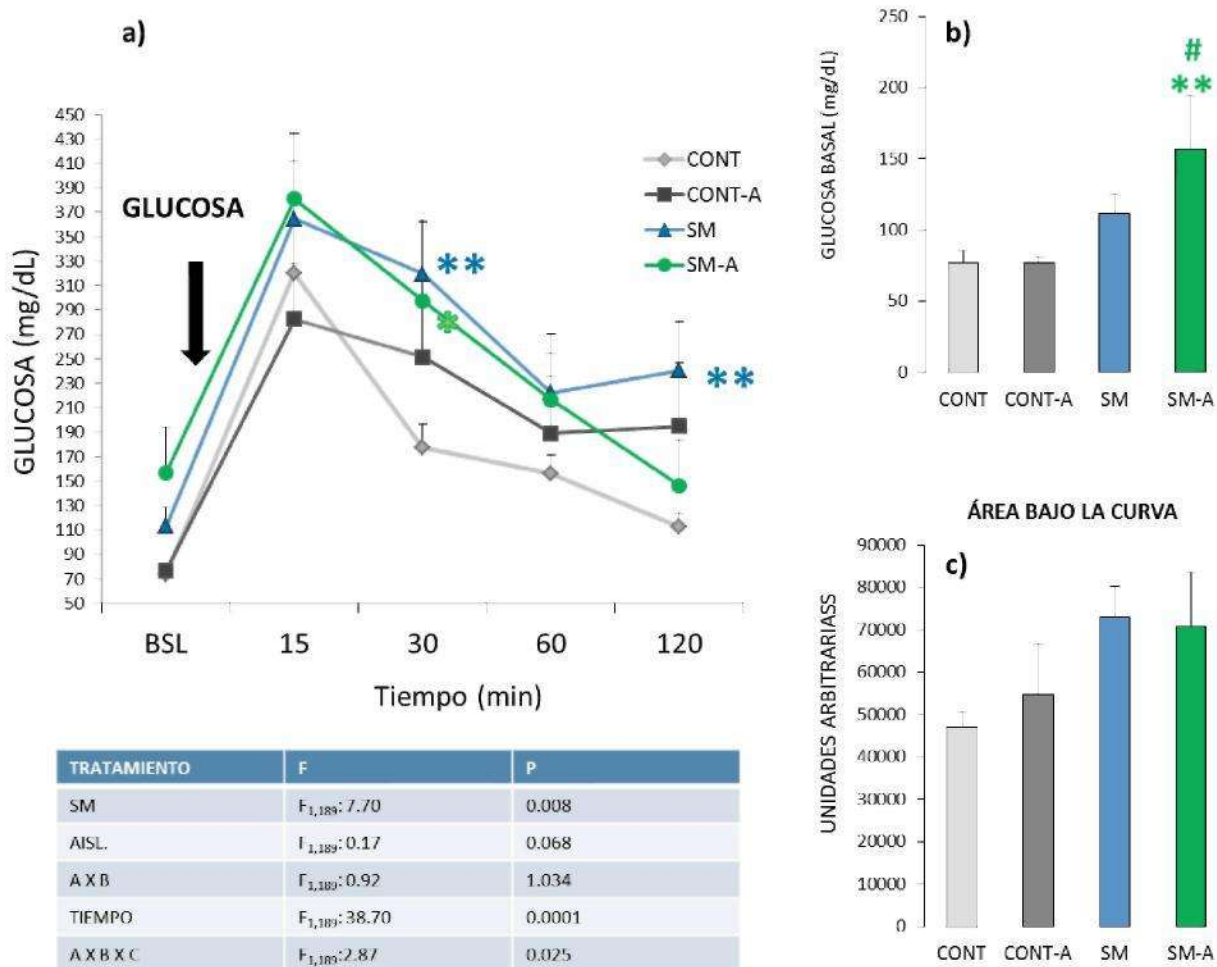


Figura 6. La SM y su combinación con el aislamiento social causan alteraciones en la homeostasis de la glucosa. a) Concentraciones de glucosa en sangre en condiciones de ayuno, 15, 30, 60 y 120 min después de inducir hiperglicemia de animales control (CONT, rombos), control aislado (CONT-A, cuadrados), separación maternal (SM, triángulos) y separación maternal aislado (SM-A, círculos). Tabla con valores estadísticos. **b)** Concentración de glucosa en ayuno. **c)** Área bajo la curva de tolerancia a la glucosa. (PROM $\pm$ EST, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs CONT, # $p \leq 0.05$ vs CONT-A, CONT: $n=8$, CONT-A: $n=8$, SM: $n=11$, SM-A: $n=8$) (ANOVA de medidas repetidas: Factor A: SM, Factor B: AISL, Factor C: Tiempo, AxB: Interacción SMxASL, AxBxC: Interacción SMxAISLxTiempo).

Química sanguínea y parámetros de obesidad.

No observamos efecto de ninguno de los tratamientos en el resto de la química sanguínea (triglicéridos, colesterol); en cambio, los animales SM-A muestran un aumento en el peso corporal al P60 ($F_{1, 62}$: 2.03, $p = 0.0026$, Tabla. 2). Por otro lado, observamos un efecto significativo de la SM sobre el porcentaje de tejido adiposo peri-gonadal (g tejido / g peso corporal). ($F_{1,53}$: 4.19, $p = 0.04$, Tabla. 2). Las comparaciones post-hoc mostraron una diferencia significativa del grupo SM-A respecto a los animales CONT-A

Tabla 2. Marcadores de síndrome metabólico. Concentración de colesterol y triglicéridos en plasma, peso corporal y tejido adiposo peri-gonadal de animales control (CONT.), control aislado (CONT-A), separación maternal (SM) y separación maternal aislado (CONT). ($PROM \pm EST$, * $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.01$ vs CONT)

	COLESTEROL mg/dL	TRIGLICÉRIDOS mg/dL	PESO g	GRASA TESTICULAR g/g pc
CONT	27.8 $\pm$ 27.8 (n=20)	72.7 $\pm$ 9.8 (n=20)	291.1 $\pm$ 5.3 (n=19)	4.8 $\pm$ 0.3 (n=7)
CONT-A	22.0 $\pm$ 22.0 (n=12)	64.4 $\pm$ 5.4 (n=13)	289.1 $\pm$ 7.6 (n=14)	3.5 $\pm$ 0.3** (n=12)
SM	22.5 $\pm$ 22.5 (n=15)	75.5 $\pm$ 17.4 (n=16)	280.3 $\pm$ 6.2 (n=18)	3.1 $\pm$ 0.2** (n=16)
SM-A	22.5 $\pm$ 22.5 (n=9)	70.1 $\pm$ 9.5 (n=10)	318 $\pm$ 5.2* (n=12)	3.5 $\pm$ 0.2** (n=6)

Curva de Crecimiento

El análisis de varianza mostró efecto significativo de la edad ($F_{3, 347}: 2083.46, p = 0.0001$), el AISL ($F_{1, 347}: 29.43, p = 0.0001$ Fig. 4a) y la SM ($F_{1, 347}: 39.38, p = 0.0001$ Fig. 7a); sin embargo, no encontramos interacción entre la edad y el AISL ($F_{3, 347}: 1.531, p = 0.208$ o la SM y el AISL ($F_{1, 347}: 3.145, p = .078$), pero sí entre la edad y la SM ($F_{3, 347}: 10.916, p = 0.0001$), el AISL, la SM y la edad ($F_{3, 347}: 8.011, p = 0.0001$).

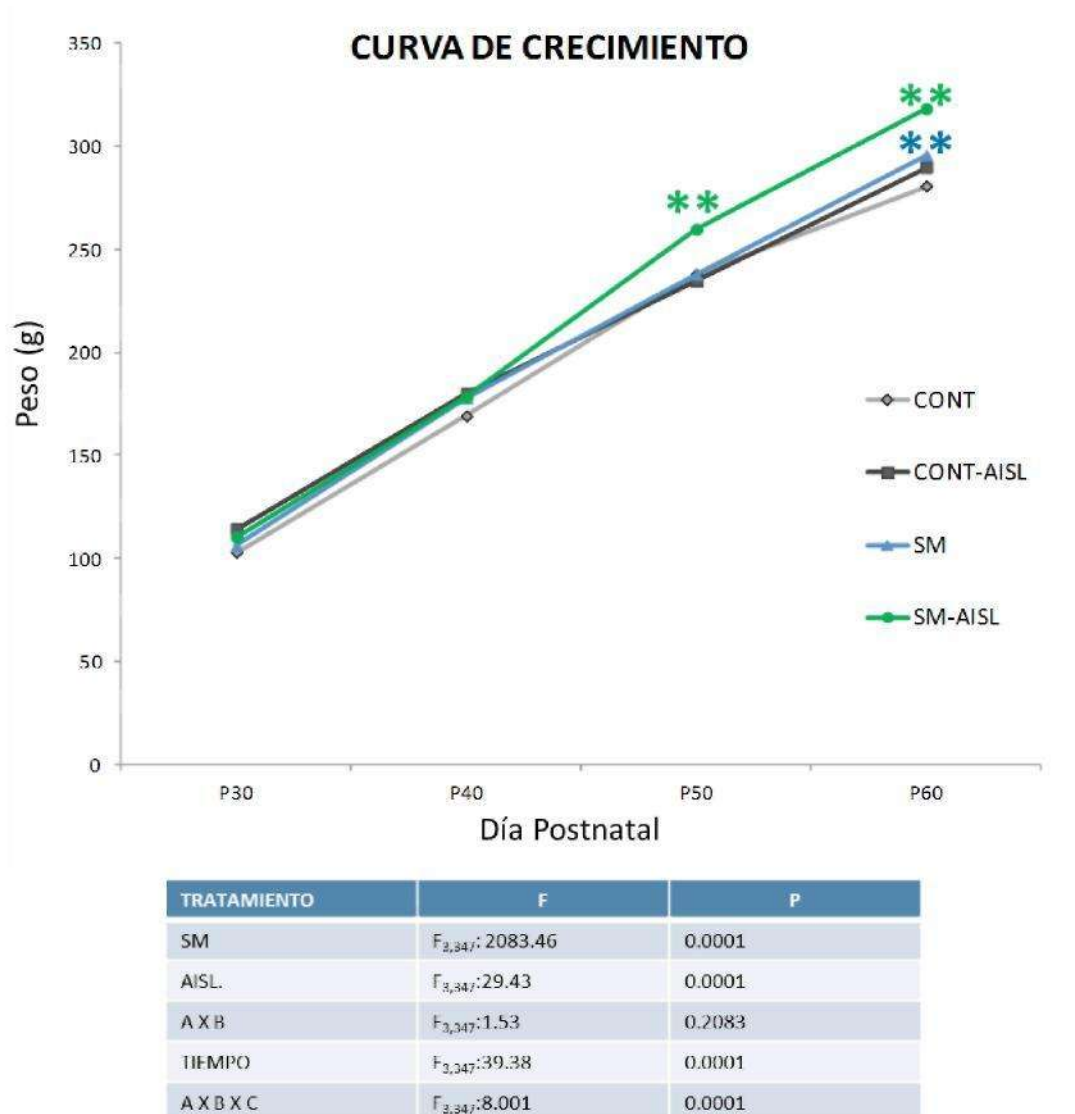


Figura 7. Curva de crecimiento. Se muestra el peso corporal de los días postnatales 30, 40, 50 y 60 en el grupo control (CONT, rombos), control aislado (CONT-A, cuadrados), separación maternal (SM, triángulos) y separación maternal aislado (SM-A, círculos). ($PROM \pm EST$, $*p \leq 0.05$, $**p \leq 0.01$ vs CONT).

DISCUSIÓN

Las experiencias adversas durante la vida temprana causan un alto grado de patologías como depresión, ansiedad y síndrome metabólico, las cuales se desencadenan a raíz de una desregulación en el sistema neuroendocrino. En el presente trabajo demostramos que tanto la SM como el aislamiento social causan un aumento en la conducta tipo depresiva; sin embargo, observamos que el aislamiento social aumenta la reactividad al estrés mientras que la SM causa alteraciones en la homeostasis de la glucosa, sin afectar los parámetros de la química sanguínea.

La SM y el aislamiento social causan una estragja de respuesta en la prueba de nado forzado

De acuerdo a lo previamente reportado, observamos que al comparar únicamente a los animales SM con el grupo CONT, los machos SM muestran un aumento en la conducta tipo depresiva, aumento en la concentración basal de CORT y tolerancia anormal a la glucosa; sin embargo algunas de estas diferencias no se observan al realizar el análisis de varianza de todos los grupos.

La prueba de nado forzado ha utilizado ampliamente para el análisis de la conducta tipo depresiva en roedores⁵³. Una gran cantidad de estudios han reportado que los animales muestran una conducta pasiva en esta prueba cuando se les ha sometido a un estresor previo, la cual se revierte con el tratamiento con antidepresivos⁵³. Nuestros resultados mostraron una disminución en el tiempo de escalamiento y un aumento en el tiempo de nado en los animales SM y SM-A, mientras que observamos una disminución en la latencia a flotar en los grupos CONT-A y SM-A. En conjunto, estos datos indican que nuestros tratamientos causan una conducta pasiva en respuesta al estresor; lo cual, puede ser interpretado como un aumento en la conducta tipo depresiva. En congruencia con nuestros hallazgos, estudios previos han reportado que la SM causa una conducta pasiva en esta prueba^{5,7}, aunque los resultados son muy variados¹⁴. Es más, en 2009 Ryu y colaboradores demostraron que la SM causa un aumento en la conducta pasiva en la prueba de nado forzado de forma independiente del aislamiento⁵². Por otro lado, se ha observado que el aislamiento social aumenta la conducta tipo depresiva⁵⁴.

En 2013 Liu y colaboradores observaron que los animales aislados en la edad adulta son más vulnerables al efecto del estrés por inmovilización en esta prueba⁵⁵; en concordancia, nuestros resultados mostraron que los animales SM-A muestran una disminución en el tiempo de escalamiento y la latencia a la primera flotación, así como un aumento en el tiempo de nado. Esto nos indica que, de forma similar a lo observado en los animales adultos sometidos a estrés por inmovilización, el aislamiento social aumenta la conducta pasiva causada por la SM.

Efecto de la SM y el AISL sobre la respuesta al estrés

Posteriormente evaluamos el efecto de la SM y el aislamiento social sobre la reactividad del eje HPA. Para esto, los animales fueron sometidos a un evento amenazante: el nado en un tanque de agua fría. Este, es un estímulo adverso que activa una cascada de hormonas como CRH o ACTH y culmina con la liberación de GC^{56,57}. De acuerdo a lo esperado, observamos que la exposición al estrés por nado causó un aumento significativo en la concentración de CORT en plasma, en todos los grupos 15 minutos después de someter a los animales al estresor y que todos los grupos logran restaurar los niveles de CORT a concentraciones similares a las basales 60 minutos después del estímulo. Estudios previos han demostrado que utilizando el laberinto elevado en cruz (Elevated Plus Maze, EPM) durante 5 minutos, el nado en agua fría durante 10 minutos, o inmovilización por 15 minutos⁵ como estímulos estresantes se observa un incremento en los niveles de ACTH y CORT 5 minutos después de la exposición al estresor, es decir 10-20 minutos después de iniciado el estímulo. Estos datos concuerdan con nuestros resultados ya que el pico máximo de secreción de CORT se observa 15 minutos después de la exposición al estrés.

Por otro lado, el análisis de varianza mostró un efecto significativo del AISL más no de la SM sobre la reactividad del eje HPA; sin embargo observamos un aumento en la concentración basal de CORT al comparar únicamente al grupo SM con los animales CONT. Estudios previos han mostrado que la SM causa un aumento en los niveles de CORT basales^{5,58,59} y en respuesta al estrés⁶⁰ aunque estos hallazgos aún son controversiales^{50,7}. Por otro lado, observamos que el aislamiento social causa un aumento en los niveles basales de CORT que se revierte en los animales SM-AISL, lo cual podría ser

congruente con la teoría del desajuste evolutivo. Esta teoría establece que “las experiencias adversas durante la infancia desencadenan un proceso adaptativo que daría como consecuencia un individuo con una mejor capacidad para adaptarse a un ambiente adverso en la etapa adulta”⁶¹; sin embargo el aumento en la reactividad al estrés en los animales CONT-AISL y SM-AISL observado en el presente trabajo contradice esta idea. A este respecto, Biggio y colaboradores observaron que la SM atenúa el efecto del aislamiento social sobre los niveles basales de CORT y en respuesta a un episodio de estrés por electroshocks en las patas. Estos resultados difieren de nuestras observaciones en puntos importantes: los autores sugieren que la SM no afecta los niveles basales de CORT en los adultos y que el aislamiento social disminuye la actividad del eje HPA⁶¹, mientras que nuestras observaciones sugieren que tanto la SM como el aislamiento social aumentan la concentración basal de CORT. Si bien, la descripción de los efectos del aislamiento social sobre los niveles de CORT difieren a lo largo de la literatura^{62,63,64,65}, existen numerosos reportes que indican que este estresor causa un aumento en la concentración basal de CORT tanto en machos como en hembras^{66,67,68,69,68}. Es más, de forma similar a nuestros resultados, se ha observado que los animales SM muestran un aumento en la reactividad del eje HPA cuando se combina con un estresor crónico impredecible⁶. Por otro lado, en el presente trabajo utilizamos un estímulo estresante moderado: el estrés por nado; el cual, difiere de formas significativas al estímulo estresante del electroshock. Esto, pudiera explicar, al menos parcialmente, las discrepancias entre los estudios de Biggio y colaboradores y el nuestro.

SM y vulnerabilidad metabólica

En general, el efecto de la SM sobre la vulnerabilidad metabólica ha sido poco estudiado, por esta razón se analizó el efecto de la SM sobre los marcadores de síndrome metabólico y posteriormente su interacción con el aislamiento social. Observamos que la SM aumenta la concentración de glucosa en ayuno y el área bajo la curva de tolerancia a la glucosa, al comparar únicamente a este grupo con el CONT, y que los animales SM no logran restaurar los niveles de glucosa 120 min después de la hiperglicemia. En conjunto, estos datos sugieren que la SM causa resistencia a la insulina y vulnerabilidad metabólica.

Estudios previos habían observado que la SM no modifica la concentración de glucosa en ayuno en machos¹⁰ ni hembras¹¹; esta discrepancia podría deberse a que los autores no observan efecto de la SM sobre los niveles basales de corticosterona, la cual tiene un importante efecto como modulador de concentración de glucosa en sangre bajo condiciones de estrés.

Efecto de la SM y el aislamiento social sobre la vulnerabilidad metabólica

Adicionalmente, al realizar el análisis de varianza de todos los grupos observamos que la concentración de glucosa en ayuno del grupo SM-A fue significativamente mayor que en el resto de los grupos. Esta evidencia podría sugerir que, de forma opuesta a lo observado en las concentraciones basales de CORT el aislamiento social aumentaría el efecto de la SM en condiciones de ayuno.

En la prueba de tolerancia a la glucosa observamos que únicamente el grupo CONT logró restaurar los niveles de glucosa a concentraciones similares a su basal al cabo de 120 minutos; no obstante, no encontramos diferencias significativas al analizar el área bajo la curva de glucosa de los diferentes tratamientos. Esto sugiere que tanto la SM, como el aislamiento social causan alteraciones en la tolerancia a la glucosa, las cuales podrían ser indicativas de resistencia a la insulina. Aunque, dado que solamente el grupo SM mostró diferencias significativas respecto al CONT en el punto de 120 min, podemos concluir que el efecto del aislamiento es menor que el de la SM. Estudios previos realizados por el grupo de Brunton y colaboradores mostraron que la exposición al estrés prenatal, el cual es considerado un modelo de bajo peso al nacimiento, se relaciona con una desregulación de la homeostasis de la glucosa⁷⁰. De la misma forma que los resultados obtenidos en nuestro trabajo, Brunton y colaboradores no observaron cambios en la concentración de glucosa en ayuno en los animales sometidos a estrés prenatal, pero sí un aumento en la concentración de glucosa 15 min. después de la hiperglicemia; no obstante, a diferencia de lo observado en el grupo SM y SM-A, los animales sometidos a estrés prenatal

logran restaurar los niveles de glucosa 120 min después de la hiperglicemia. Esto sugiere que la ventana de desarrollo postnatal es un periodo de vulnerabilidad importante para la programación de la respuesta metabólica y que las consecuencias de la exposición al estrés durante este periodo podrían ser mayores.

Por otro lado, estudios previos han demostrado que la SM causa desórdenes alimenticios cuando se presenta en combinación con estresores metabólicos como la dieta obesogénica¹¹ o sociales como el aislamiento⁶⁸, las cuales se acompañan de aumento en la conducta tipo depresiva y de los niveles de CORT. En el presente trabajo hipotetizamos que estas alteraciones podrían estar relacionadas con un aumento en los marcadores de síndrome metabólico como la concentración de glucosa en ayuno, triglicéridos y colesterol. Sin embargo, de forma opuesta a lo esperado, no observamos efecto de la SM o el aislamiento social sobre estos parámetros; en cambio, confirmamos las observaciones realizadas por Jahng y colaboradores donde los animales SM-A muestran un aumento en el peso corporal, probablemente debido a un aumento en el consumo de alimento¹⁴, Jahng y colaboradores han propuesto que el mayor consumo de alimento observado en los animales SM podría estar relacionado con alteraciones en las vías de recompensa dopaminérgicas y en consecuencia un patrón de alimentación compulsiva causado por un aumento en la conducta de ansiedad; lo cual, a largo plazo aumentaría la vulnerabilidad metabólica.

Adicionalmente, observamos un aumento en el porcentaje de tejido adiposo perigonadal en los animales SM-A respecto al grupo CONT-A pero no respecto al grupo CONT ni SM. De forma similar, Paternain y colaboradores observaron que el estrés inducido por la SM previene el aumento en el contenido de tejido adiposo peri-gonadal inducido por la dieta obesogénica en hembras; sin embargo no observan diferencias entre el grupo control y SM en condiciones de alimentación estándar¹¹.

En conjunto, podemos sugerir que el estrés crónico por separación maternal y el aislamiento social en la adolescencia aumentan la vulnerabilidad al estrés y la vulnerabilidad metabólica de forma diferencial; sin embargo aún es necesario evaluar la progresión de estos factores durante periodos de tiempo más largos, o en condiciones de estrés más severo.

CONCLUSIÓN.

El estrés crónico por separación maternal y el aislamiento social en la adolescencia aumentan la respuesta al estrés y la vulnerabilidad metabólica de forma diferencial.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. González de Rivera y Revuelta, J. TRASTORNOS ADAPTATIVOS Y DE ESTRES. in Congr. Virtual Psiquiatr. (2000).
2. Heim, C., Newport, D. J., Mletzko, T., Miller, A. H. & Nemeroff, C. B. The link between childhood trauma and depression: insights from HPA axis studies in humans. *Psychoneuroendocrinology* 33, 693–710 (2008).
3. Kaufman, D. et al. Early-life stress and the development of obesity and insulin resistance in juvenile bonnet macaques. *Diabetes* 56, 1382–1386 (2007).
4. Mesa-Gresa, P. & Moya-Albiol, L. Neurobiología del maltrato infantil: El “ciclo de la violencia.” *Rev. Neurol.* 52, 489–503 (2011).
5. Lajud, N., Roque, A., Cajero, M., Gutierrez-Ospina, G. & Torner, L. Periodic maternal separation decreases hippocampal neurogenesis without affecting basal corticosterone during the stress hyporesponsive period, but alters HPA axis and coping behavior in adulthood. *Psychoneuroendocrinology* 37, 410–420 (2012).
6. Cotella, E. M., Mestres Lascano, I., Franchioni, L., Levin, G. M. & Suárez, M. M. Long-term effects of maternal separation on chronic stress response suppressed by amitriptyline treatment. *Stress* 16, 477–81 (2013).
7. Lee, J.-H., Kim, J. Y. & Jahng, J. W. Highly Palatable Food during Adolescence Improves Anxiety-Like Behaviors and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Dysfunction in Rats that Experienced Neonatal Maternal Separation. *Endocrinol. Metab. (Seoul, Korea)* 29, 169–78 (2014).
8. Maniam, J. & Morris, M. J. Palatable cafeteria diet ameliorates anxiety and depression-like symptoms following an adverse early environment. *Psychoneuroendocrinology* 35, 717–728 (2010).
9. Bernardi, J. R. et al. Early life stress interacts with the diet deficiency of omega-3 fatty acids during the life course increasing the metabolic vulnerability in adult rats. *PLoS One* 8, e62031 (2013).
10. Foscolo, D. R., Foscolo, R. B., Marubayashi, U., Reis, A. M. & Coimbra, C. C. Neonatal maternal separation affects endocrine and metabolic stress responses to ether exposure but not to restraint exposure in adult rats. *Metab Brain Dis* 23, 375–385 (2008).
11. Paternain, L., Martisova, E., Milagro, F. I., Ramirez, M. J. & Campion, J. Postnatal maternal separation modifies the response to an obesogenic diet in adulthood in rats. *Dis Model Mech Sep*; 5, 691–697 (2012).
12. Krolow, R. et al. Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism*. 62, 1268–1278 (2013).
13. Krolow R1, Noschang C, Arcego DM, Huffell AP, Marcolin ML, Benitz AN, Lampert C, Fitarelli RD, D. C. Sex-specific effects of isolation stress and consumption of palatable diet during the prepubertal period on metabolic parameters. *Metabolism* 62, 1268-1278 (2013).
14. Jahng, J. W. An animal model of eating disorders associated with stressful experience in early life. *Horm. Behav.* 59, 213–20 (2011).
15. Revuelta, J. L. G. de R. y. ESTRÉS, HOMEOSTASIS Y ENFERMEDAD . *Psicol. Médica* 2, 122 (1994).
16. Selye, H. [The concept of stress as it appears in 1952]. *Brux Med* 32, 2383–2392 (1952).
17. Tsigos, C. & Chrousos, G. P. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors

and stress. *J Psychosom Res* 53, 865–871 (2002).

18. McEwen, B. S. Brain on stress: how the social environment gets under the skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 Suppl , 17180–5 (2012).

19. Sapolsky, R. M., Romero, L. M. & Munck, A. U. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 21, 55–89 (2000).

20. Márquez, F. balada. C, R. Nadal, D. Redolar, J. S. FARMACOLOGÍA Y ENDOCRINOLOGÍA DEL COMPORTAMIENTO. 198–200 (Editorial UOC, 2012).

21. Sapolsky, R. M. A mechanism for glucocorticoid toxicity in the hippocampus: increased neuronal vulnerability to metabolic insults. *J Neurosci* 5, 1228–1232 (1985).

22. Azcárate Mengual, M. A. Trastorno de estrés postraumático. Daño cerebral secundario a la violencia. (Editorial Díaz de Santos, S.A., 2007).

23. McEwen, B. S. Allostasis, allostatic load, and the aging nervous system: role of excitatory amino acids and excitotoxicity. *Neurochem Res* 25, 1219–1231 (2000).

24. Sapolsky, R. M. McEwen-Induced Modulation of Endocrine History: A Partial Review. *Stress* 2, 1–12 (1997).

25. McEwen, B. S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 840, 33–44 (1998).

26. Rivadeneira, C. A. M. J. D. Algunas puntualizaciones sobre el estrés. *Rev. Ter. Cogn. Conduct.* (2010).

27. Zimmet, P., Alberti, K. G. & Serrano Rios, M. A New International Diabetes Federation (IDF) Worldwide Definition of the Metabolic Syndrome: the Rationale and the Results. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 58, 1371–1375 (2005).

28. Teicher, M. H. Scars that won't heal: the neurobiology of child abuse. *Sci. Am.* **286**, 68–75 (2002).

29. International Diabetes Federation. IDF diabetes atlas, 5th ed.; retrieved from www.idf.org (2011).

30. MS. OMS | Diabetes. Nota Descr. No312 1 (2012).

31. La, D., Mellitus, D., En, C., Gestacional, D. & Intolerancia, L. DIABETES MELLITUS : Definición y Etiopatogenia. *Diabetes MellitusDefinicion Y Etiopatogenia* 5, 5 (1997).

32. FEDERICO URIBE LONDOÑO, JULIANA GÓMEZ FRANCO, L. F. M. & FRANCO, L. A. L. T. Ejes neuroendocrinos del estrés, síndrome metabólico y alteraciones psiquiátricas del síndrome de Cushing. *IATREIA* 18, (2005).

33. RAUL BASTARRACHEA SOSA. CORTISOL E IL-6 Y SU RELACION CON EL ESTRES, LA GRASA VISCERAL, LA INSULINA Y LA ENFERMEDAD ARTERIAL CORONARIA. *Rev. la Fac. Salud Pública y Nutr.* (2006).

34. Kaur, J. A comprehensive review on metabolic syndrome. *Cardiol. Res. Pract.* 2014, (2014).

35. Andrew, R. & Gale, C. Glucocorticoid metabolism and the metabolic syndrome: associations in an elderly cohort. *Exp. ...* 110, 284–290 (2002).

36. Dallman, M. F. et al. Glucocorticoids, the etiology of obesity and the metabolic syndrome. *Curr Alzheimer Res* 4, 199–204 (2007).

37. Girod, J. P. & Brotman, D. J. Does altered glucocorticoid homeostasis increase cardiovascular risk? *Cardiovasc Res* 64, 217–226 (2004).

38. Barker, D. J. The origins of the developmental origins theory. *J Intern Med* 261, 412–417 (2007).

39. Daskalakis, N. P., Bagot, R. C., Parker, K. J., Vinkers, C. H. & de Kloet, E. R. The three-hit concept of vulnerability and resilience: toward understanding adaptation to early-life adversity outcome. *Psychoneuroendocrinology* 38, 1858–1873 (2013).
40. Decaluwe V, Braet C, Fairburn CG. Binge eating in obese children and adolescents. *Int J Eat Disord* [Internet]. 2003;33(1):78–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12474202>.
41. Silverman AB, Reinherz HZ, Giaconia RM. The long-term sequelae of child and adolescent abuse: A longitudinal community study. *Child Abuse Negl.* 1996;20(8):709–23.
42. Teicher, M. H. Scars that won't heal: the neurobiology of child abuse. *Sci. Am.* **286**, 68–75 (2002).
43. Alciati, A., Gesuele, F., Casazza, G. & Foschi, D. The relationship between childhood parental loss and metabolic syndrome in obese subjects. *Stress Health* 29, 5– 13 (2013).
44. Wildes, J. E. et al. Self-reported binge eating in severe pediatric obesity: impact on weight change in a randomized controlled trial of family-based treatment. *Int. J. Obes. (Lond)*. 34, 1143–1148 (2010).
45. Gustafson, T. B. & Sarwer, D. B. Childhood sexual abuse and obesity. *Obes. Rev.* 5, 129–135 (2004).
46. Pine, D. S., Goldstein, R. B., Wolk, S. & Weissman, M. M. The association between childhood depression and adulthood body mass index. *Pediatrics* 107, 1049– 1056 (2001).
47. López-Navarrete, G. E., Perea-Martínez, A. & Loredó-Abdalá, A. Artículo de revisión Obesidad y maltrato infantil. Un fenómeno bidireccional. *Acta pediátrica México* 29, 342–346 (2008).
48. Hernández, S. El modelo animal en las investigaciones biomédicas. *Biomedicina* 252–256 (2006).
49. Loria, A., Pollock, D. & Pollock, J. Early Life Stress Sensitizes Rats to Angiotensin II–Induced Hypertension and Vascular Inflammation in Adult Life. *Hypertension* 55, 494– 499 (2010).
50. Paternain, L. et al. Postnatal maternal separation modifies the response to an obesogenic diet in adulthood in rats. *Dis. Model. Mech.* 5, 691–7 (2012).
51. Fone, K. C. F. & Porkess, M. V. Behavioural and neurochemical effects of post-weaning social isolation in rodents-relevance to developmental neuropsychiatric disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 32, 1087–102 (2008).
52. Ryu, V., Yoo, S. B., Kang, D. W., Lee, J. H. & Jahng, J. W. Post-weaning isolation promotes food intake and body weight gain in rats that experienced neonatal maternal separation. *Brain Res* 1295, 127–134 (2009).
53. Rodríguez, J. & Contreras, C. Los fármacos antidepresivos y la conducta de inmovilidad en la prueba de nado forzado: participación de los sistemas de neurotransmisión. *Arch Neurocién* 5, n 2, 74–83 (2000).
54. Evans, J., Sun, Y., McGregor, A. & Connor, B. Allopregnanolone regulates neurogenesis and depressive/anxiety-like behaviour in a social isolation rodent model of chronic stress. *Neuropharmacology* 63, 1315–26 (2012).
55. Liu, X. et al. Effects of group housing on stress induced emotional and neuroendocrine alterations. *Brain Res.* 1502, 71–80 (2013).
56. Mingote Adán, J. C. C. N.-W. M. 172 M. I. N. 1999. El estrés del médico : manual de autoayuda / José Carlos Mingote Adán, Francisco Pérez Corral. (MADRID : DIAZ DE SANTOS, 1999).

57. Antonio M. Rey González, L. L. A. La Psiquiatría y sus Nombres: Diccionario de Epónimos. (2000).
58. Stiller, A. L., Drugan, R. C., Hazi, A. & Kent, S. P. Stress resilience and vulnerability: the association with rearing conditions, endocrine function, immunology, and anxious behavior. *Psychoneuroendocrinology* 36, 1383–95 (2011).
59. Uchida, S. et al. Early life stress enhances behavioral vulnerability to stress through the activation of REST4-mediated gene transcription in the medial prefrontal cortex of rodents. *J. Neurosci.* 30, 15007–15018 (2010).
60. Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C. B., Plotsky, P. M. & Monteggia, L. M. Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *Eur. J. Neurosci.* 25, 3091–8 (2007).
61. Biggio, F. et al. Maternal separation attenuates the effect of adolescent social isolation on HPA axis responsiveness in adult rats. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 24, 1152–61 (2014).
62. Hong, S. et al. Social isolation in adolescence alters behaviors in the forced swim and sucrose preference tests in female but not in male rats. *Physiol. Behav.* 105, 269–75 (2012).
63. Zlatković, J. & Filipović, D. Bax and B-cell-lymphoma 2 mediate proapoptotic signaling following chronic isolation stress in rat brain. *Neuroscience* 223, 238–45 (2012).
64. Filipović, D., Zlatković, J., Pavićević, I., Mandić, L. & Demajo, M. Chronic isolation stress compromises JNK/c-Jun signaling in rat brain. *J. Neural Transm.* 119, 1275–1284 (2012).
65. Zlatković, J. et al. Different susceptibility of prefrontal cortex and hippocampus to oxidative stress following chronic social isolation stress. *Mol. Cell. Biochem.* 393, 43–57 (2014).
66. Krügel, U., Fischer, J., Bauer, K., Sack, U. & Himmerich, H. The impact of social isolation on immunological parameters in rats. *Arch. Toxicol.* 88, 853–5 (2014).
67. Colaianna, M. et al. Neuroendocrine profile in a rat model of psychosocial stress: relation to oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 18, 1385–99 (2013).
68. Jahng, J. W., Yoo, S. B., Ryu, V. & Lee, J.-H. Hyperphagia and depression-like behavior by adolescence social isolation in female rats. *Int. J. Dev. Neurosci.* 30, 47–53 (2012).
69. Reis, F. M. C. V, Albrechet-Souza, L., Franci, C. R. & Brandão, M. L. Risk assessment behaviors associated with corticosterone trigger the defense reaction to social isolation in rats: role of the anterior cingulate cortex. *Stress* 15, 318–28 (2012).
70. Brunton, P. J. et al. Sex-specific effects of prenatal stress on glucose homeostasis and peripheral metabolism in rats. *J. Endocrinol.* 217, 161–173 (2013).

ANEXOS

LISTA DE ABREVIATURAS

SM	Separación Maternal
SM-A	Separación Maternal Aislado
CONT	Control
CONT-A	Control Aislado
GC	Glucocorticoides
CORT	Corticosterona
HPA	Hipotálamo Hipófisis Glándulas Suprarrenales
P	Día Postnatal
ANOVA	Análisis de Varianza
SNC	Sistema Nervioso Central
CRH	Hormona liberadora de Corticotropina
PVN	Núcleo Paraventricular
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa
cHDL	Lipoproteínas de alta densidad
PA	Presión Arterial
ECV	Enfermedad Cardiovascular
OMS	Organización Mundial de la Salud
DM	Diabetes Mellitus
DMT1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus Tipo 2
DMG	Diabetes Gestacional

GLUT	Proteína transportadora de Glucosa
GH/IGH	Hormona de Crecimiento Hormona
TSH	estimulante de la tiroides Ácido
EDTA	Etilendiaminotetraacético

Por sus siglas en inglés

Early life stress	Estrés durante las etapas tempranas de la vida
EGIR	European Group for the Study of Insulin Resistance
ATP-III	Adult Treatment Panel III
NCEP	National Cholesterol Education Program

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1.	11
Esquema de los principales componentes de eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y de los mecanismos de la retroalimentación negativa	
Figura 2.	13
Relación entre homeostasis y carga alostática	
Figura 3.	25
Estrategia experimental	
Figura 4.	31
La SM, el AISL y su combinación causan una estrategia pasiva en la prueba de nado forzado	
Figura 5.	33
La SM en combinación con el aislamiento social aumenta los niveles de corticosterona	
Figura 6.	34
La SM y su combinación con el aislamiento social causan alteraciones en la homeostasis de la glucosa	
Figura 7.	36
Curva de crecimiento	

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.	14
Definiciones de síndrome metabólico propuestas por la OMS, el EGIR y la ATP	
Tabla 2.	35
Definiciones de síndrome metabólico propuestas por la OMS, el EGIR y la ATP	