



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Consumo de sacarosa más estrés: relación entre leptina, corticosterona y alteraciones histológicas en la glándula adrenal en ratas machos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Yadira Díaz Aguila

Director

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Tlaxcala, Tlax.

Febrero 2017



Universidad Autónoma de Tlaxcala

Posgrado en Ciencias Biológicas

Consumo de sacarosa más estrés: relación entre leptina, corticosterona y alteraciones histológicas en la glándula adrenal en ratas machos

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P r e s e n t a

Yadira Díaz Aguila

Comité Tutorial

Dra. Leticia Nicolás Toledo

Dr. Francisco Castelan

Dra. Margarita Cervantes Rodriguez

Dra. DoraLuz Corona Quintanilla

Dra. Estela Cuevas Romero

Dr. Jorge Rodriguez Antolin

Tlaxcala, Tlax.

Febrero 2017

i Financiamiento

Esta investigación fue realizada en las inmediaciones del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Unidad Periférica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se contó con el apoyo recibido de la beca CONACyT 366801-DAY para la realización del proyecto de tesis.

ii Oficio de autorización



Universidad Autónoma de Tlaxcala
Secretaría de Investigación Científica y Posgrado

Doctorado en Ciencias Biológicas



COORDINACIÓN DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE TLAXCALA
PRESENTE

Los abajo firmantes, miembros del jurado evaluador del proyecto de tesis que **Yadira Díaz Aguila** realiza para la obtención del grado de **Doctora en Ciencias Biológicas**, expresamos que, habiendo revisado la versión final del documento de tesis, damos la aprobación para que ésta sea impresa y defendida en el examen correspondiente. El título que llevará es **“Consumo de sacarosa más estrés: relación entre leptina, corticosterona y alteraciones histológicas en la glándula adrenal en ratas machos”**.

Sin otro particular, aprovechamos para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
TLAXCALA, TLAX., FEBRERO 10 DE 2017


DR. FRANCISCO CASTELAN


DRA. ESTELA CUEVAS ROMERO


DR. JORGE RODRÍGUEZ ANTOLÍN


DRA. MARGARITA CERVANTES RODRÍGUEZ


DRA. DORA LUZ CORONA QUINTANILLA



Sistema Institucional de Gestión de la Calidad Certificado bajo la Norma:
ISO 9001:2008-NMX-CC-9001-IMNC-2008



Km. 1.5 Carretera Tlaxcala-Puebla CP 90070, Tlaxcala, Tlax. Tel/Fax: 01(246)462-15-57 e-mail: posgradocbtcuat@gmail.com

iii Agradecimientos

Al Doctorado en Ciencias Biológicas por el programa tan amplio que ofrece a los aspirantes y por el apoyo del mismo para la realización del proyecto aquí presentado.

Al apoyo recibido de la beca CONACyT 366801-DAY para la realización del proyecto de tesis.

Se contó con la tutoría de los Drs. Leticia Nicolás Toledo, Estela Cuevas Romero, Francisco Castelán, Mauricio Díaz Muñoz, Margarita Cervantes Rodríguez, Jorge Rodríguez Antolín y Dora Luz Corona Quintanilla.

También se contó con la asesoría de la QFB Laura García Rivera.

iv Dedicatoria

A Dios quién supo guiarme por el buen camino, darme fuerzas para seguir adelante y no desmayar en los problemas que se presentaban, enseñándome a encarar las adversidades sin perder nunca la dignidad ni desfallecer en el intento.

A mi familia quienes por ellos soy lo que soy.

Para mis padres por su apoyo, consejos, comprensión, amor, ayuda en los momentos difíciles. Me han dado todo lo que soy como persona, mis valores, mis principios, mi carácter, mi empeño, mi perseverancia, mi coraje para conseguir mis objetivos.

A mis hermanos por estar siempre presentes, acompañándome para poderme realizar.

A mi hija, Samara eres mi gran motivación, libras mi mente de todas las adversidades que se presentan, y me impulsas a superarme cada día para ofrecerte siempre lo mejor.

A mi directora de tesis, Dra., Leticia Nicolas Toledo, mi más amplio agradecimiento por haberme confiado este trabajo, por su paciencia por mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de tesis y llegar a la conclusión del mismo. Cuya experiencia y educación han sido mi fuente de motivación durante estos años.

A todos mis compañeros, ya que con ellos he compartido el laboratorio e incontables horas de trabajo y buenos ratos.

A mis amigos por los buenos y malos momentos, por aguanterme y por escucharme. ¿Quién puede pedir más? Me han dado animos en este camino, cuando estuve a punto de tirar la toalla, por eso y muchas cosas más gracias.

“La dicha de la vida consiste en tener siempre algo que hacer, alguien a quien amar y alguna cosa que esperar”. Thomas Chalmers

RESUMEN

Niños y adolescentes son vulnerables a los efectos del estrés crónico, debido a que tienen una glándula adrenal inmadura y cambiante, aunado a su preferencia por alimentos ricos en azúcares, pueden desarrollar enfermedades metabólicas en edad adulta. Anteriormente se informó que una dieta alta en sacarosa desde la infancia hasta edad adulta promueve cambios histológicos en la glándula adrenal y modificaciones metabólicas, sin afectar los niveles de corticosterona. Sin embargo, se desconoce cuándo inician estas alteraciones. Por otra parte, estresores crónicos causan alteraciones fisiológicas, sin conocer el efecto de éstos sobre las glándulas adrenales de sujetos infantiles y jóvenes. Aunado a esto, la leptina, regula la actividad del eje Hipotálamo-Hipofisis-Adrenal, pero los resultados son contradictorios. Por ello, este estudio se realizó para evaluar de forma detallada la morfología de la glándula adrenal, la relación entre corticosterona y leptina en ratas infantiles, jóvenes y adultas, expuestas a estrés y alimentados con una alta dieta en sacarosa. Ratas machos Wistar de 21 días de edad, asignadas al azar en los siguientes grupos: control (C), estrés crónico por restricción (St), dieta alta en sacarosa (S30), y estrés crónico por restricción más dieta alta en sacarosa (St/S30), durante uno, dos y tres meses. Todos los grupos se sacrificaron por decapitación al concluir su tratamiento para colectar la sangre y extraer las glándulas adrenales. Las glándulas fueron fijadas en Bouin-Duboscq, deshidratadas en alcoholes ascendentes, aclaradas en xileno e incluidas en paraplast-Xtra. Los cortes histológicos fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina para analizar las diferentes variables de cada una de las zonas de la corteza y médula adrenal. Se realizó la tinción de Tricrómica de Masson para observar colágeno, la tinción de Wright para cuantificar células inmunes e Inmunoquímica de Ki-67 para proliferación celular. Los datos fueron analizados con una ANOVA de dos vías con su respectiva prueba post-hoc para observar diferencias entre grupos. Para el porcentaje de células se realizó una prueba de Chi-cuadrada seguida de una prueba de Fisher. En general al primer mes, en los grupos St observamos atrofia en la corteza, aumento en el número de células inmunes y en el área cubierta por los vasos sanguíneos. Al segundo mes, en los grupos St observamos atrofia acompañada de una inflamación generalizada en ambas glándulas. Por otro lado, los grupos S30 además de la atrofia de la glándula, disminuyen las concentraciones de corticosterona. Finalmente, al tercer mes, tanto los grupos St como los S30 provocan atrofia en ambas glándulas, incrementa la proliferación celular y disminuye el área de los vasos sanguíneos,

pero, en los grupos S30 incrementa el número de células inmunes y se observa la presencia de colágeno en la glándula derecha. Concluyendo que la exposición al estrés crónico es más drástica en infantes, y que la disminución de los niveles de corticosterona puede ser el desencadenante de las alteraciones metabólicas en edad adulta.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	13
1.2 Glándula adrenal	16
1.2.1 Desarrollo de la Glándula Adrenal	16
1.2.2 Estructura y función de la corteza adrenal adulta.....	18
1.3 Glucocorticoides	24
1.3.1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y estrés	30
1.4 Leptina.....	32
2 ANTECEDENTES.....	37
2.1 Modelos animales.....	37
2.1.1 Consumo de sacarosa	37
2.1.2 Estrés	37
2.1.3 Leptina.....	38
2.1.4 Dietas ricas en carbohidratos, leptina y estrés.....	40
3 JUSTIFICACIÓN	41
4 HIPÓTESIS	43
5 OBJETIVOS	43
5.1 Objetivo general	43
5.2 Objetivos específicos (en función del tiempo, consumo de sacarosa y el estrés)	43
6 MATERIAL Y MÉTODOS	44
6.1 Manejo de los animales	44
6.2 Grupos experimentales.....	44
6.3 Protocolo de la dieta.....	44
6.4 Inducción de estrés	46
6.5 Obtención de muestras sanguíneas, glándula adrenal y tejido adiposo.....	46

6.6	Determinación de corticosterona y leptina.....	47
6.7	Análisis histológico de la glándula adrenal.....	47
6.7.1	Área de los vasos sanguíneos.....	48
6.7.2	Conteo de células inmunes.....	48
6.7.3	Proliferación celular.....	49
6.8	Análisis estadístico.....	50
7	RESULTADOS.....	51
7.1	Primer mes.....	51
7.1.1	Parámetros de crecimiento.....	51
7.1.2	Adiposo Visceral.....	51
7.1.3	Peso y características histológicas de la glándula adrenal.....	53
7.1.4	Parámetros Hormonales.....	64
7.2	Segundo mes.....	65
7.2.1	Parámetros de crecimiento.....	65
7.2.2	Adiposo Visceral.....	65
7.2.3	Peso y características histológicas de la glándula adrenal.....	66
7.2.4	Parámetros Hormonales.....	78
7.3	Tercer mes.....	79
7.3.1	Parámetros de crecimiento.....	79
7.3.2	Adiposo Visceral.....	79
7.3.3	Peso y características histológicas de la glándula adrenal.....	80
7.3.4	Parámetros Hormonales.....	94
8	DISCUSIÓN.....	95
9	CONCLUSIONES.....	109

10 PERSPECTIVAS	110
11 BIBLIOGRAFÍA.....	111
12 ANEXOS.....	131
12.1 Anexo 1. Deshidratación de la glándula adrenal.....	131
12.2 Anexo 2. Tinción de hematoxilina-eosina.....	132
12.3 Anexo 3. Tinción Tricrómica de Masson.....	134
12.4 Anexo 4. Tinción de Wright.....	136
13. PUBLICACIONES	138

1 INTRODUCCIÓN

Síndrome metabólico. El síndrome metabólico (SM) es una condición que incluye diversas alteraciones fisiológicas y metabólicas (intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, presión arterial y obesidad) que aumentan la probabilidad de desarrollar hipertensión, diabetes, dislipidemias (Kahn y cols. 2005) y obesidad abdominal, esta última considerada como marcador de la disfunción del tejido adiposo en la regulación de apetito-saciedad relacionada con la secreción de leptina (Furukawa y cols. 2004). Según los criterios de “The American Heart Association in conjunction with the National Heart, Lung, and Blood Institute (AHA/NHLBI)” el SM en humanos se define como la presencia de tres o más de los siguientes criterios: 1) Circunferencia de cintura >90 cm en hombres y >80 cm en mujeres; 2) Triglicéridos séricos >150 mg/dL; 3) Presión arterial >130/85 mmHg; 4) HDL <40mg/dL en hombres y <50mg/dL en mujeres; 5) Glucosa en suero >100mg/dL (Kasai y cols. 2008).

Un área la cual ha recibido mucho interés en recientes años ha sido el papel de los glucocorticoides en el desarrollo del SM. Un exceso de glucocorticoides en la circulación sanguínea puede deberse a: 1) una continua y pronunciada hipersecreción de glucocorticoides por adenomas ectópicos en la glándula pituitaria produciendo elevada concentración de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), 2) presencia de adenomas en la glándula suprarrenal y 3) una respuesta yatrogénica a la administración de dosis elevadas de corticoides exógenos durante un tiempo prolongado en el tratamiento de enfermedades reumáticas crónicas (Pinheiro y cols. 2009), dando como resultado el Síndrome de Cushing’s (Vegiopoulos y Herzig 2007). El Síndrome de Cushing’s se caracteriza por altos niveles de cortisol en la circulación sanguínea y desarrollo de obesidad visceral, hipertensión, hiperglucemia, resistencia a insulina y dislipidemias. Un tratamiento utilizado en pacientes con Síndrome de Cushing’s, es el uso del RU38486, es un esteroide sintético con propiedades antiprogesterona y antiglucocorticoides, actúa como un inhibidor competitivo del receptor a glucocorticoide, y lo que han observado es una disminución en la presión sanguínea, en la concentración de glucosa y triglicéridos sanguíneos (Stimson y Walker 2007).

Dieta. En humanos, el consumo de bebidas endulzadas con azúcar o jarabe de maíz de alta fructosa promueven el desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y síndrome metabólico (SM) (Bray 2013). Niños y adolescentes son particularmente vulnerables a desarrollar obesidad debido a su preferencia de consumir alimentos ricos en azúcares y grasas (Powell y Nguyen, 2013). Continuando en modelos animales, se ha mostrado que una dieta enriquecida de sacarosa o de alta fructosa estimula la aparición de los componentes asociados con SM, incluyendo el aumento de la acumulación de grasa visceral y una concentración sérica elevada de insulina y triglicéridos (Stanhope y Havel 2008). Además, una dieta rica en sacarosa durante la infancia también promueve alteraciones metabólicas dependiendo de la hora y la duración de la exposición (Fuente-Martín y cols. 2012). Sin embargo, la información sobre este tema sigue siendo escasa, y se necesitan más estudios que se centren en el análisis de los efectos de una dieta rica en azúcar en función de diversos órganos metabólicos.

Glucocorticoides. Las glándulas suprarrenales secretan hormonas relevantes que intervienen en el metabolismo, la regulación de la presión arterial y homeostasis de la glucosa (De Silva y Wijesiriwardene 2007). En niños y adolescentes, el desarrollo de obesidad y SM se ha relacionado con el aumento de los niveles de cortisol (Reinehr y cols. 2014). Sin embargo, existe evidencia que sugiere que los niveles de cortisol son independientes al desarrollo de estas patologías (Kjölhede y cols. 2014). La obesidad en la infancia también puede estar asociada con adrenarquia, donde la glándula adrenal secreta niveles más altos de andrógenos (Dunger y cols. 2005), aproximadamente a partir de los 6-8 años de edad (Hui y cols. 2009). Del mismo modo, las poblaciones jóvenes tienen una glándula adrenal inmadura y cambiante (Meikle y cols. 2007, Mouritsen y cols. 2014) que pueden afectar a la respuesta al estrés y también aumentar la predisposición a padecer enfermedades metabólicas en la edad adulta.

Estrés. La ansiedad y la depresión son situaciones propensas a estrés excesivo o crónico que pueden estar vinculados a la obesidad abdominal (Isasi y cols. 2015). En la actualidad se ha relacionado el desarrollo de SM con la presencia de estrés crónico. En apoyo a esta hipótesis, en hombres y mujeres con SM se ha observado un incremento en los niveles de cortisol relacionados con la presencia de estrés (Epel y cols. 2000), y un aumento en la secreción de cortisol urinario en hombres con esta misma patología (Brunner y cols. 2002), pero la asociación entre la obesidad

y el SM con la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal en niños y adolescentes aún se desconoce. En este sentido, se ha demostrado que la secreción de esteroides suprarrenales se ve afectada en los niños prepúberes con sobrepeso (Pintor et al. 1984). Algo similar sucede en edad adulta, donde pacientes con obesidad pueden presentar niveles de cortisol altos, normales o incluso bajos (Marniemi y cols. 2002). Con respecto a esto se sabe que la exposición a eventos estresantes, en la niñez o adolescencia, puede afectar la pubertad, la composición corporal, así como el desarrollo de obesidad, SM y DM2 (Pervanidou y Chrousos 2012;). En México se ha mostrado un alto índice de estrés en edad adulta, debido a que de los 75 mil infartos que se registran al año, el 25% está asociado a enfermedades derivadas del cansancio y la presión del trabajo según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Dieta más estrés. Una dieta rica en sacarosa promueve la alteración histológica de las glándulas suprarrenales en ratas macho adultas asociados con indicadores metabólicos (Martínez Calejman y cols. 2012). En modelos animales se ha observado que modificaciones en la dieta durante la gestación y/o lactancia aunada a la presencia de estrés, aumenta la susceptibilidad de desarrollar obesidad en edad adulta, modificando la presencia del receptor de glucocorticoides en hipocampo, hipotálamo, hígado y riñón, altera las concentraciones de corticosterona y leptina (Tamashiro y cols. 2009), así como el peso de la glándula adrenal (Khorram y cols. 2011). Mientras, que si las modificaciones en la dieta y/o la presencia de estrés son posteriores a la lactancia se puede observar un incremento en la concentración de corticosterona, infiltración de lípidos en la zona fascicular (Martínez- Calejman y cols. 2012), así como un incremento en el peso de la glándula adrenal (Bruder-Nascimento y cols. 2013). Pero una dieta rica en sacarosa en la vida temprana altera la morfología de las zonas de la corteza suprarrenal, lo que lleva a los cambios asociados con el SM en ratas adultas (Díaz-Aguila y cols. 2016). Además, se encontró que el consumo de azúcar reduce los niveles de corticosterona en suero y la actividad de la 11-beta hidroxisteroide deshidrogenasa hepática, coincidiendo con una respuesta de estrés reducida (Corona-Pérez y cols. 2015). La síntesis de esteroides en células suprarrenales también se ve afectada por el consumo de sacarosa elevada (Astor y cols. 2009). El estrés crónico en ratas adultas produce hipertrofia o hiperplasia de la zona fasciculada (ZF) y una infiltración importante

de leucocitos (Jennewein y cols. 2015), que se ha asociado con los niveles de corticosterona elevadas inducidas por ACTH (Ulrich-Lai y cols. 2006).

Leptina. La leptina, además de regular la ingesta de alimento y el gasto energético a través de sus receptores en el hipotálamo (Roubos y cols. 2012), también puede regular la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal. En pacientes obesos no se ha observado una correlación entre los niveles de cortisol y los niveles de leptina (Goodson y cols. 2014). En modelos animales, se ha observado que la leptina aumenta la producción de CRH en el núcleo paraventricular, incrementa la síntesis de glucocorticoides en la glándula adrenal, modifica la presencia de receptores de glucocorticoides en hipocampo e hipotálamo, y favorece, la síntesis de epinefrina y norepinefrina en la medula adrenal, catecolaminas involucradas en la respuesta al estrés (Trevenzoli y cols. 2010). Sin embargo, existen datos contradictorios, donde se muestra que leptina reduce la secreción de cortisol basal y bloquea el aumento de cortisol inducido por la secreción de ACTH en células adrenocorticales de bovinos (Bornstein y cols. 1997), sugiriendo que los efectos de la leptina circulante sobre los niveles plasmáticos de glucocorticoides puede ser, en parte, mediada por una acción directa sobre la esteroidogénesis adrenal. Estos estudios mencionan que la leptina puede actuar centralmente a nivel de hipotálamo o periféricamente a nivel de la glándula adrenal para provocar un importante control de retroalimentación sobre la liberación de glucocorticoides.

1.2 Glándula adrenal

1.2.1 Desarrollo de la Glándula Adrenal

Las glándulas adrenales se desarrollan a partir de dos tejidos embrionarios separados: a) la médula que es derivada de las células de la cresta neural, se origina en la proximidad de la aorta dorsal, mientras que b) la corteza se desarrolla a partir del mesodermo intermedio. La aparición de la glándula adrenal en forma de primordio adrenogonadal (AGP, por sus siglas en inglés) se da en el día 9 embrionario en los roedores (E9) y se caracteriza por la expresión del factor esteroideogénico 1 (SF1, por sus siglas en inglés) un receptor nuclear esencial para el desarrollo y esteroidogénesis adrenal. El AGP bilateral aparece como un engrosamiento del epitelio celómico entre la cresta urogenital y el mesentérico dorsal, cada AGP contiene una población mixta de

células progenitoras adrenogonadales y somáticas. Las células del AGP que expresan SF1 delimitan el epitelio e invaden el mesénquima subyacente del mesodermo intermedio (Xin y cols. 2015). Posteriormente, entre los días E11.5-E13.5, la mayoría de las células del AGP migran a la parte dorsolateral para formar el primordio gonadal y un subconjunto de células del AGP que expresna niveles altos de SF1 migran a la parte dorsomedial para formar el primordio adrenal o la zona adrenal fetal. Estas células persisten como islas discretas dispersas por toda la glándula adrenal embrionaria hasta el nacimiento y en última instancia, se unen y se diferencian en las células cromafines productoras de catecolaminas de la médula adrenal. Mientras tanto, la glándula adrenal comienza a separarse de los alrededores del mesénquima y queda encapsulada con la formación de una capa fibrosa que recubre el desarrollo de las células corticales (Figura 1; Xin y cols. 2015). Conforme la encapsulación progresa, se inicia la formación de la corteza adulta (o zona definitiva) esté proceso en gran medida se completa en el día E14.8. Histológicamente la zona fetal desaparece durante la pubertad en los machos o en el momento de la primera gestación en las hembras (Figura1; Xin y cols. 2015), durante estas últimas fases el gen DAX-1 juega un papel esencial en el mantenimiento de células, equilibrando la renovación de células progenitoras y la diferenciación de la corteza suprarrenal/esteroidogénesis (Xin y cols. 2015).

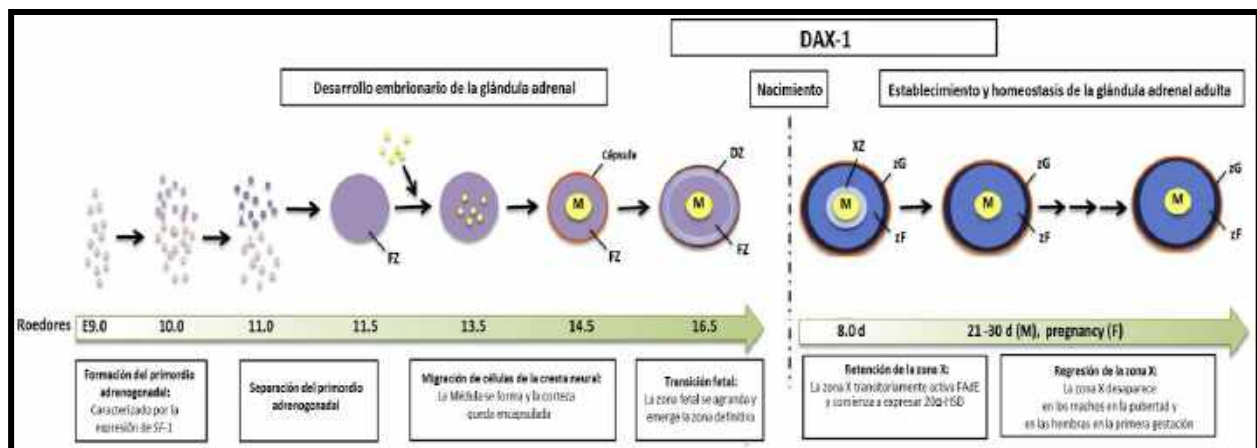


Figura 1. Organogénesis de glándula adrenal. Modelo de la formación de la glándula adrenal, iniciando con el primordio adrenogonadal hasta la zonación de la corteza definitiva. FZ, corteza fetal; DZ, zona definitiva; XZ, zona X; zG, zona glomerular; zF, zona fascicular; M, médula. Los colores muestran el tipo de células: primordio adrenogonadal, violeta; células adrenales fetales, púrpura; células gonadales, violeta; células de la cresta neural, amarillo; (Modificado de Xing y cols. 2015).

1.2.2 Estructura y función de la corteza adrenal adulta

Las glándulas adrenales son de forma triangular o redonda situadas en el polo superior de los riñones con la grasa perirrenal, pesan alrededor de 40-60mg en roedores, su anatomía difiere dependiendo de su ubicación: la glándula izquierda se encuentra por detrás de la cola del páncreas, de la arteria del bazo y el estómago. Mientras que la glándula derecha se encuentra por detrás de la parte inferior de la vena cava, con la cara anterolateral contra el hígado (Mitani 2014).

Histológicamente, la glándula adrenal está cubierta por una capa de tejido conectivo denominada capsula. Esta se encuentra dividida por dos compartimientos principales, que secretan diferentes hormonas: corteza y médula. En la corteza encontramos otras tres zonas anatómicas y funcionalmente distintas. Debajo de la capsula se encuentra la ZG, esta zona estrecha contiene células epiteliales cilíndricas dispuestas en racimos redondos, tienen un citoplasma basófilo y poco contenido de lípidos, constituye aproximadamente el 15% de la corteza, y produce el mineralocorticoide aldosterona responsable del control de volumen de sangre y la homeostasis electrolítica, además de ser el sitio principal de división celular (Figura 4). Debajo de la ZG se encuentra la ZF, contiene células epiteliales poligonales con ricas gotas de lípidos dispuestos en columnas radiales separados por capilares fenestrados, presenta fibras de colágeno paralelas a los capilares con conexión que simulan la apariencia de una escalera. La ZF constituye el 80% de la corteza, secreta predominantemente glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores), que tienen efectos influyentes sobre el metabolismo, el sistema cardiovascular, y el sistema inmune. La ACTH es el más potente estímulo tanto de la secreción de corticosterona como de aldosterona y no solo actúa en la transcripción, estimulación y liberación de esteroides adrenales, sino también aumenta la expresión de genes involucrado en la esteroidogénesis (Rainey 1999). La zona cortical más interna es la ZR, rodeada por una estructura similar a una red, ésta se compone de capilares trenzados que alojan a los vasos sanguíneos y una red de fibras en forma de nido de abeja, en donde cada espacio corresponde a una célula poliédrica con lisosomas prominentes. La ZR, constituye sólo entre el 5-7% de la corteza, es el segundo lugar de síntesis de andrógenos (dehidroepiandrosterona y androstenediona), también es el sitio donde inicia el proceso de muerte celular (Yates y cols.

2013; Figura 2). Sin embargo, recientemente, se ha observado una cuarta zona entre la ZG y la ZF, conocida como zona de células indeferenciadas (ZU) (Figura 2), debido a que no tiene una función endocrina específica porque carece de enzimas esteroidogénicas. El contenido de lípidos de la ZU es menor que los observados en las otras zonas, sus células expresan SF-1, y su arquitectura capilar también difiere, estas características histológicas son similares a la zona intermedia (Carter y Lever 1954) o zona de transición (Greep y Deane 1947). También se ha observado una tasa alta de proliferación y migración celular en la ZU, donde las células de la parte externa migran de forma centrípeta con los días, mientras que las células de la parte interna migran de forma centrífuga (Mitani y cols. 2003), estos mecanismos están regulados por el sistema renina angiotensina (RAS, por sus siglas en inglés) y por la ACTH. La médula conforma la masa interna de la glándula está formada por células grandes, poligonales, epiteliales contenidas dentro de una vaina de colágeno y rodeadas de sinusoides venosos, estas células producen catecolamina, principalmente adrenalina pero en algunos casos y dependiendo de la especie noradrenalina, en respuesta a estímulos recibidos de fibras simpáticas preganglionares del nervio esplácnico mayor (Yates y cols. 2013; Figura 3C). Una densa acumulación de fibrillas de colágeno marca la unión cortico-medular, con una organización fibrilar muy diferente dentro de estas dos zonas, evidentes en cada lado de estas uniones (Bassett y West 1997).

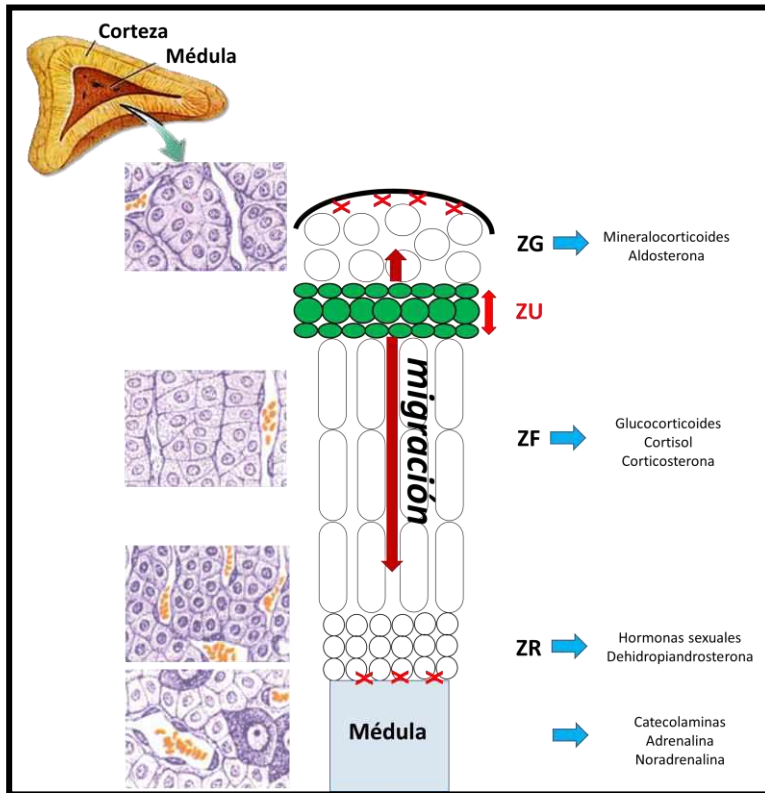


Figura 2. Histología de la glándula adrenal. Se observan las zonas que conforman la corteza y la médula así como las hormonas secretadas en cada una de ellas. Células proliferativas, *verde*; células de la corteza adrenal, *blanco*, muerte celular, *equis roja* (Modificado de Mitani y cols. 2014).

La glándula adrenal es un tejido endocrino altamente vascularizado, debido a su alto consumo energético en la esteroidogénesis, recibe suministro de sangre por parte de la aorta ventral, por la arteria renal, o bien por una rama caudal de la aorta (para la glándula adrenal izquierda) o por la arteria frénica (para la glándula adrenal derecha) (Vinson y cols. 1985; Figura 3A). De las arterias, la sangre se dispersa en una red de arteriolas en la cápsula. Dos tipos de arterias emerger desde el plexo arteriolar capsular y penetran en la corteza y la médula. La arteria medular que irriga a la médula, pasa a través de la corteza sin ramificación. Una vez que alcanza la médula, se divide en arteriolas y capilares. La arteria corticis que surge directamente de la cápsula y forma una red anastomótica alrededor de las células de la zona glomerular (ZG), luego continúa en forma de capilares centrípetas entre las columnas de células en la zona fascicular (ZF).

En la ZR, los capilares se abren en un gran plexo sinusoidal que rodea a las células endocrinas. La densa vascularización de la corteza asegura que cada adrenocito este en contacto con al menos una de las células endoteliales debido a que necesitan una gran cantidad de oxígeno para llevar a cabo los procesos de fosforilación e hidroxilación así como la obtención de nutrientes. Por otra parte, la proximidad entre las células endocrinas y el lecho vascular facilita una liberación rápida de esteroides en el torrente sanguíneo (Thomas y cols. 2003). Esta anatomía única de suministro de sangre en la corteza adrenal proporciona un gradiente espacial interesante de los esteroides adrenales en diferentes zonas y puede ser un mecanismo de regulación que contribuye para los caracteres distintos de células en cada zona (Xing y cols. 2015; Figura 3B). La glándula adrenal también está ricamente innervada, con la mayoría de los plexos nerviosos localizados en la región capsular. Sus fibras se originan principalmente del nervio esplácnico mayor y de los plexos abdominales asociados al sistema nervioso simpático autónomo, junto con algunas contribuciones parasimpáticas de los nervios frénicos y vagales. Los haces nerviosos penetran en la corteza, sobre todo en asociación con los vasos sanguíneos. Similar a la vasculatura, la mayoría de estos nervios postganglionares terminan en la médula. Aunque controvertido, se ha planteado la hipótesis de que la innervación de los vasos sanguíneos regula el flujo de sangre en el lecho capilar cortical. Por otra parte los estudios *in vitro* han informado de la

regulación del flujo sanguíneo cortical por neuropéptidos liberados en respuesta a la estimulación del nervio esplácnico (Xing y cols. 2015; Figura 3C).

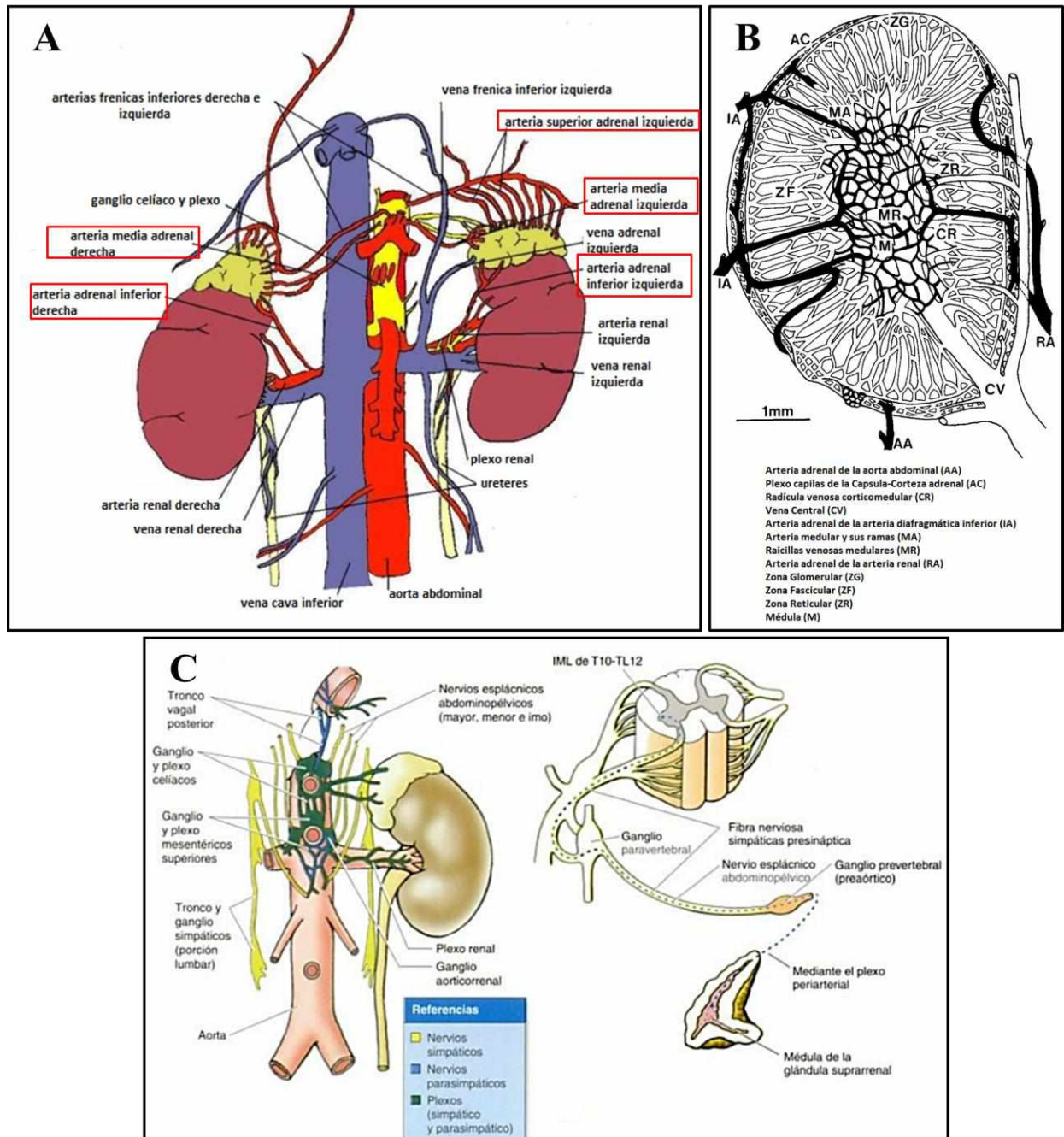


Figura 3. Suministro de sangre e innervación adrenal. A) Drenaje venoso y arterial de la glándula adrenal; *recuadros rojos*, principales arterias que irrigan a la glándula. B) Representación esquemática de la vasculatura adrenal de rata. C) Innervación adreno-corticomedular, se observan las diferentes plexos que innervan a la glándula adrenal.

La matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) de la glándula adrenal, se compone de glicoproteínas, las cuales desempeñan un papel importante en la glándula adrenal fetal y adulta. La glándula adrenal de ratas adultas, presenta colágeno tipo I que es la principal glicoproteína presente en la cápsula externa, así como niveles moderados de colágeno IV, fibronectina y laminina. El colágeno IV, fibronectina y laminina rodean cada célula de la ZG. La expresión de cada una de estas glicoproteínas disminuye progresivamente al interior de las regiones de la corteza. En la ZR, se observa sólo colágeno IV. Además de variar los patrones de expresión, los componentes de ECM también tienen efectos distintos sobre la función de la glándula adrenal *in vitro* (Xing y cols. 2015). Específicamente la fibronectina, el colágeno I y el colágeno IV aumentan la expresión de 3 β -Hidroxisteroide Deshidrogenasa (3 β -HSD, por sus siglas en inglés) y la producción de aldosterona en la ZG, así como la secreción de corticosterona en la ZF en presencia de ACTH. Por el contrario, la laminina disminuye la síntesis de proteínas, la expresión de 3 β -HSD y la liberación de glucocorticoides (Otis y cols. 2007). Los cambios morfológicos también se han observado en células que crecen con diferente ECM, lo que indica cambios potenciales en la función. Del mismo modo la inducción de la 11 β -Hidroxilasa y la expresión de la enzima 21-hidroxilasa se observa en células adrenales de bovinos cultivadas con ECMs (Cheng y Hornsby 1992). Por otro lado, otros estudios han demostrado que el ECM puede orquestar una serie de funciones celulares tales como la proliferación, la diferenciación, la migración, la supervivencia y la esteroidogénesis (Wang y De Milner 2006).

En la glándula adrenal se observan células inmunes como macrófagos, mastocitos y linfocitos (González-Hernández y cols. 1994). La función de los macrófagos fagocitar, es decir sirven como eliminadores de cuerpos apoptóticos, además de su función inmunológica dentro de la glándula (Wolkersdorfer y Bornstein 1998). Las células inmunes liberan citocinas pro-inflamatorias como: La interleucina-1 (IL-1, por sus siglas en inglés) que aumenta la secreción de glucocorticoides (Franchimont y cols. 2000) e inhibe la angiotensina II (Bornstein y cols. 2004); la interleucina-6 (IL-6, por sus siglas en inglés) que aumenta la aldosterona en la ZG (Willenberg y cols. 2008) y aumenta el retículo endoplasmico liso, el número y tamaño de mitocondrias, estimula la liberación de cortisol y la angiogénesis en la ZF (Franchimont y cols. 2000), disminuye la P450_{scc}, el SF-1, y las enzimas 3 β -hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2, la 17 α -

hidroxilasa/liasa y la 17α -hidrolasa/17,20 liasa/17,20 desmolasa), aumentando el receptor DAX-1 en la ZR (McIlmoil y cols. 2015). El Factor de necrosis tumoral-alfa ($TNF\alpha$, por sus siglas en inglés): inhibe la ACTH, incrementa el espesor de la ZG, ZF y ZR, y la expresión de la proteína StAR, la 11β -Hidroxiesteroides deshidrogenasa tipo 1 y 2 (Villar y cols. 2013). También se encuentran citocinas anti-inflamatorias como: La interleucina-4 (IL-4, por sus siglas en inglés): aumenta los niveles mRNA del receptor VEGFR1 inhibiendo la angiogénesis (Xia y cols. 2016). La interleucina-10 (IL-10, por sus siglas en inglés): inhibe la producción de la proteína StAR; la actividad de las enzimas P450_{scc} y 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa a través de ACTH (Koldzic-Zivanovic y cols. 2006). Además de sus efectos sobre la angiogénesis, la ACTH también provoca un aumento marcado de varias especies en el flujo sanguíneo (Bassett y West 1997). Este cambio en la velocidad de flujo se ha atribuido a la acción de ACTH en los mastocitos, que se encuentran dentro de la cápsula adrenal cerca de las arteriolas aferentes (Bassett y West 1997). Los mastocitos estimulan la liberación de serotonina e histamina, compuestos vasoactivos potentes (Hinson y cols. 1989).

1.3 Glucocorticoides

Síntesis. La secreción de glucocorticoides sigue un ritmo circadiano regulado por el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (Pervanidou y Chrousos 2012) que aumenta ante situaciones de ayuno prolongado y condiciones de estrés. Estas hormonas son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis metabólica y juegan un papel importante en el metabolismo de carbohidratos y lípidos (Nader y cols. 2012). Las células esteroideogénicas pueden emplear dos fuentes potenciales de colesterol para la esteroideogénesis: A través de la síntesis de colesterol de novo desde de la vía del acetato en el retículo endoplásmico y a partir del colesterol ligado a lipoproteínas circulantes. Hay dos principales mecanismos para esto: la absorción de la circulación de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, por sus siglas en inglés) (principal fuente de colesterol esteroideogénica en roedores) a través de receptores scavenger B1 (SR-B1, por sus siglas en inglés; Figura 4A; Miller y Bose 2011).

La ACTH induce la esteroideogénesis por la unión al receptor acoplado a proteína G (Kraemer y cols. 2013), a través de la activación de la adenilato-ciclasa que genera AMP cíclico

activando la proteína quinasa (PKA, por sus siglas en inglés) dependiente de AMP (Shen y cols. 2016) promoviendo la movilización de colesterol a través de endocitosis mediada por receptor (Miller y Bose 2011) hacia la mitocondria y su translocación de la membrana mitocondrial externa hacia la interna, donde ocurre la síntesis de pregnenolona por acción de la enzima citocromo P450_{scc} (CYP11A1, por sus siglas en inglés) (Miller y Bose 2011). La pregnenolona formada (P5) se metaboliza por 3 β -HSD mitocondrial o del retículo endoplásmico, que conduce a la formación a la progesterona (P4). P5 metabolizado por CYP17 forma dehidroepiandrosterona y P4 metabolizado por las formas CYP17 androstenediona que también está formado por dehidroepiandrosterona a través de la acción de 3 β -HSD. En la glándula adrenal, P4 y 17-hidroxiprogesterona son metabolizados por CYP21 para formar 11-desoxicorticosterona y 11-desoxicortisol, respectivamente, que se metaboliza adicionalmente por CYP11B1 en las mitocondrias para formar corticosterona y el cortisol, respectivamente (Papadopoulos y Miller 2012; Figura 4B).

La lipasa sensible a hormonas (HSL, por sus siglas en inglés) es la principal hidrolasa de esteroides de colesterol en los tejidos androgénicos (Kraemer y cols. 2002). En roedores deficientes de HSL disminuyen las concentraciones de corticosterona (Kraemer y cols. 2013). Para llevar a cabo la hidrólisis de esteroides de colesterol, la HSL interactúa con vimentina, así como con la proteína StAR para la transferencia de colesterol a la mitocondria para la síntesis de hormonas esteroides (Shen y cols. 2010). La deficiencia de vimentina en ratones favorece la acumulación de esteroides de colesterol en la glándula adrenal sin afectar la esteroidogénesis (Shen y cols. 2012). Estos estudios sugieren que existen otras enzimas o proteínas involucradas no solo en el almacenamiento de esteroides de colesterol, sino también podrían estar proporcionando una plataforma para la regulación o transferencia de enzimas esteroidogénicas (Figura 4A).

Mecanismo de acción. Los glucocorticoides ejercen su acción uniéndose a receptores intracelulares específicos, los receptores de corticosteroides, de los cuales existen dos tipos: receptor de Mineralocorticoides o tipo I (MRs, por sus siglas en inglés), y receptor de Glucocorticoides o tipo II (GRs, por sus siglas en inglés). Ambos pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que están presentes en el citoplasma y actúan como factor de transcripción

para regular la expresión génica. Después de la unión de cortisol o corticosterona, se produce un cambio conformacional que conduce a la disociación del receptor a partir de un gran complejo de proteínas de las cuales la proteína de choque térmico 90 (HSP 90, por sus siglas en inglés) es la más importante. Éste se trasloca del receptor unido a ligando activado al núcleo donde puede actuar de varias maneras. El GRs puede iniciar la transcripción a través de la unión a elementos de respuesta a glucocorticoides del gen diana o puede afectar la transcripción de genes a través de la interacción proteína-proteína, así como reprimir la expresión de genes en el órgano diana (van Rossum and Lamberts 2004).

Se ha demostrado que el GRs se encuentra ampliamente expresado en todo el sistema nervioso central, principalmente en las neuronas hipotálamicas y células corticotropas de la hipófisis (Berardelli y cols. 2013), donde median la retroalimentación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal regulando la respuesta al estrés (Berardelli y cols. 2013), aunque también podemos encontrar receptores en el hígado, pulmón, tejido adiposo, músculo, corteza adrenal, células β pancreáticas, glándula pituitaria anterior, tejidos determinantes para la homeostasis de lípidos, insulina y glucosa hepática (Berardelli y cols. 2013). Los MRs están situados principalmente en estructuras del sistema límbico, corazón y riñón (Vegiopoulos y Herzig 2007). Sin embargo, en humanos se han descrito algunas mutaciones raras en el gen de GRs (Figura 5A) que conducen a signos y síntomas clínicos de sensibilidad o resistencia a cortisol, favoreciendo la presencia de alteraciones metabólicas (van Rossum and Lamberts 2004; Figura 5B). Debido a estos defectos en el receptor, el cortisol no puede llevar a cabo sus acciones, como consecuencia la retroalimentación negativa central disminuye e incrementa la producción de glucocorticoides adrenales, los cuales se unen con mayor afinidad al MRs provocando cuadros clínicos de hipertensión arterial, alcalosis hipocalémica y fatiga (van Rossum and Lamberts 2004).

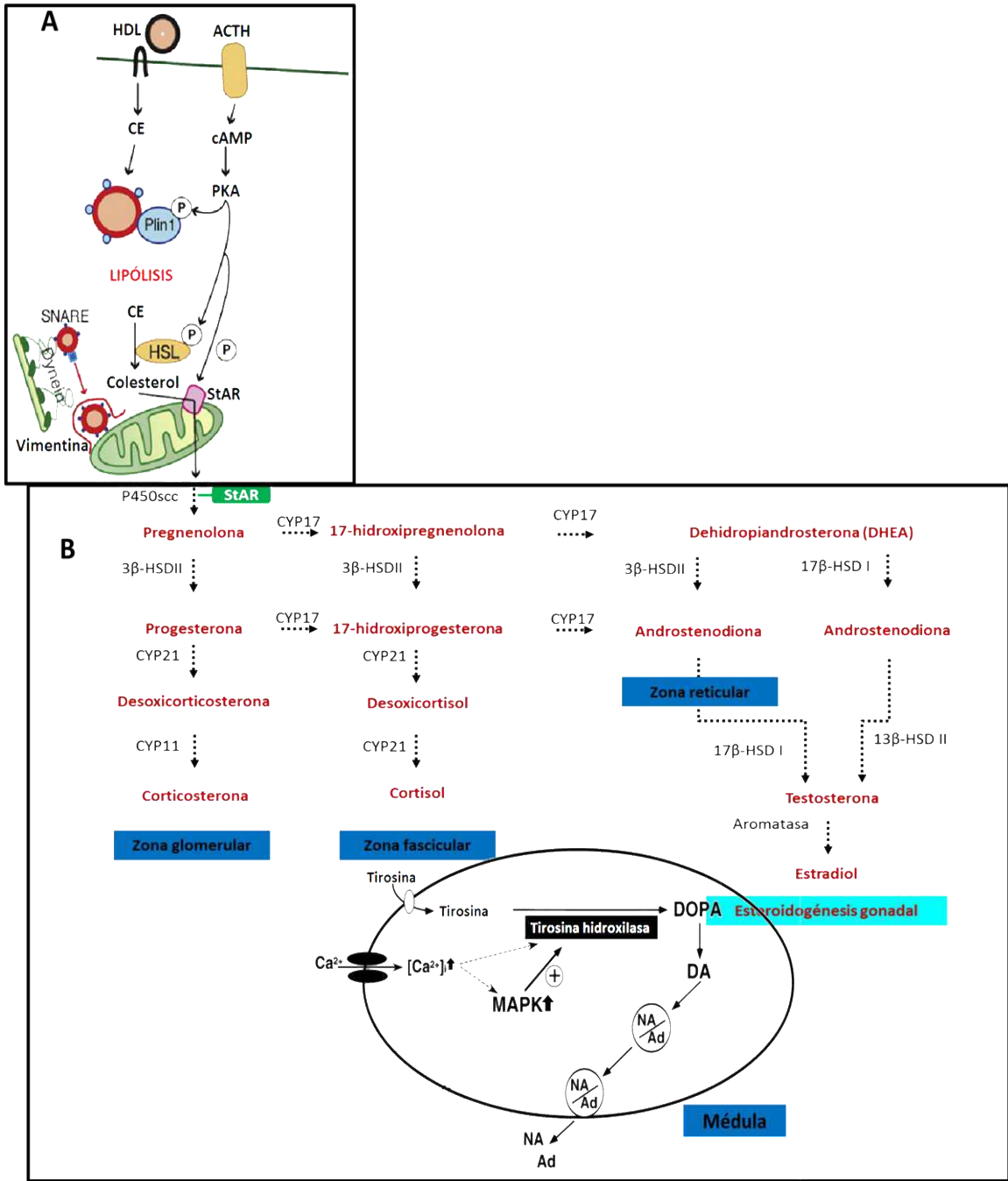


Figura 4. Esteroidogénesis adrenal. A) Movimiento del colesterol a la mitocondria. AMP cíclico, *cAMP*; Proteín kinasa A, *PKA*; Lipasa sensible a hormonas, *HSL*; ésteres de colesterol, *CE*. B) Biosíntesis adrenal. Se muestran las enzimas que participan en la esteroidogénesis de cada una de las zonas de la glándula adrenal.

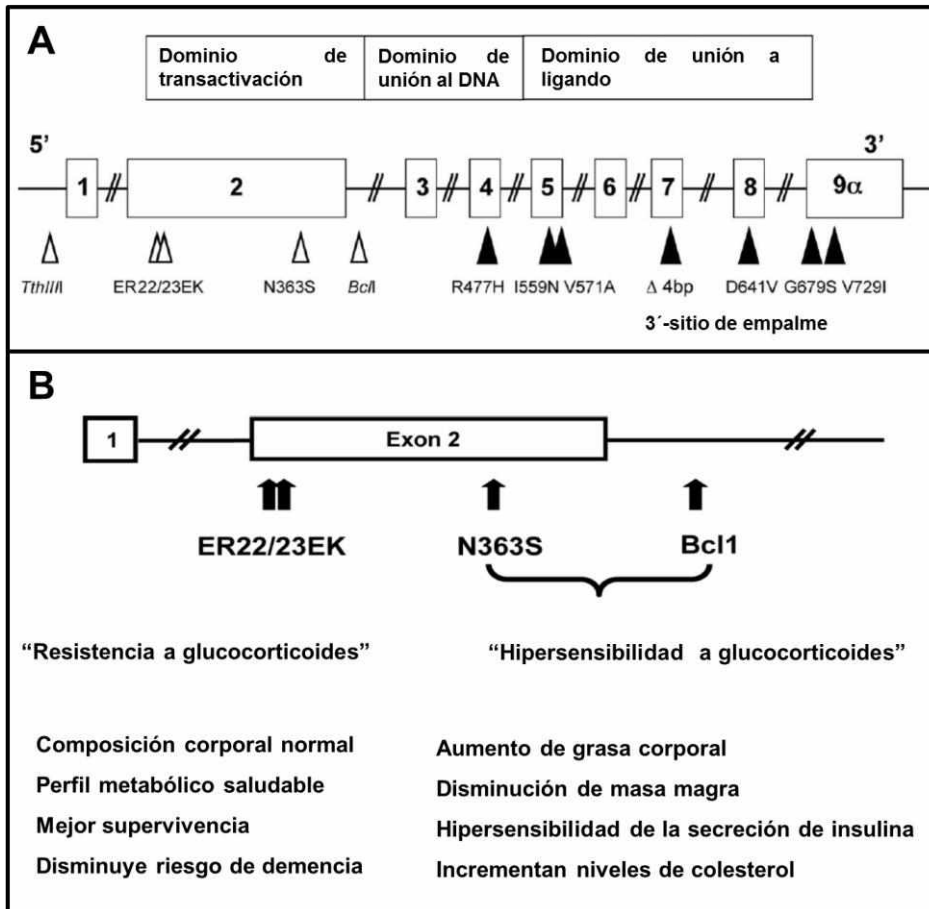


Figura 5. A) Descripción esquemática del gen GRs, que muestra los diferentes polimorfismos (triángulos blancos), los cuales han demostrado que alteran la sensibilidad de glucocorticoides y están asociados con diferencias en la composición corporal, así como mutaciones (triángulos negros) que lleva al síndrome de la resistencia de cortisol. **B) Esquema de 3 polimorfismos funcionales del gen GRs y sus asociaciones clínicas** (Modificado de van Rossum and Lamberts 2004).

Metabolismo. Un 80-85% de los glucocorticoides plasmáticos están unidos con gran afinidad a la proteína globulina de unión al cortisol (CBG, por sus siglas en inglés), y un 10-15% unido a la proteína albúmina. Al aumentar las concentraciones de glucocorticoides, la proteína CBG queda saturada (por encima de 60 nmol/L), por lo que una mayor proporción se une a la proteína albúmina. Dado que el ritmo de disociación de la albúmina es más rápido que el de la CBG, los glucocorticoides unidos a la albúmina se hallan más fácilmente a disposición de los tejidos. Los glucocorticoides libres son los únicos fisiológicamente activo, por lo que, en casos en donde se encuentran elevados los niveles de éstos, el hígado, que tiene un tiempo de tránsito sinusoidal relativamente prolongado, puede captar una cierta cantidad de glucocorticoides fijados

a su globulina de unión, además de la captación de glucocorticoides libre y de glucocorticoides unidos a albúmina, por lo que aumentaría la gluconeogénesis (Vegiopoulos y Herzig 2007).

El principal sitio de degradación de los glucocorticoides es el hígado, donde a través de varios procesos como reducción, oxidación e hidroxilación de la molécula y su ulterior conjugación con ácido glucorónico sulfato, se logra la producción de metabolitos hidrosolubles que son eliminados por la orina; en este proceso intervienen enzimas del retículo endoplásmico y del citosol. En el riñón, los glucocorticoides son degradados a cortisona (humano) o a 11-dehidrocorticosterona (roedores) por la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo2 (11 β -HSD2, por sus siglas en inglés), que muestra gran afinidad por éstos, con lo cual protege al receptor tipo 1 (mineralocorticoides) del estímulo del glucocorticoide. En general, cantidades aproximadamente iguales de los metabolitos conjugados del cortisol/corticosterona y de la cortisona/11-dehidrocorticosterona se excretan por la orina (Brousset Hernández-Jáuregui y cols. 2005); mientras que en el intestino, estos metabolitos pueden ser reabsorbidos por la circulación enterohepática, desconjugados por las bacterias y eliminados por las heces. Sólo una pequeña porción de esteroides sanguíneos libres es secretada a través de la mucosa del intestino grueso, lo que permite encontrar una pequeña porción del esteroide original, sin conjugar, en la orina o heces (Brousset Hernández-Jáuregui y cols. 2005).

Efectos metabólicos. Los glucocorticoides ejercen diversos efectos sobre todos los tejidos del organismo. Son necesarios, en concentraciones adecuadas, para conservar la homeostasis y para contar con una respuesta pertinente ante el estrés. La exposición crónica a concentraciones inadecuadas (altas o bajas) de glucocorticoides produce cambios considerables, la mayoría reversibles, en una amplia gama de tejidos y órganos. Los efectos sobre el metabolismo intermedio son muy variados y complejos. La función esencial de los glucocorticoides se hizo evidente cuando se demostró que animales adrenalectomizados no eran capaces de mantener sus reservas hepática de glucógeno ni la euglucemia si se les sometía a ayuno. Estos cambios se revertían al administrar glucocorticoides. El cortisol incrementa y la insulina disminuye la producción hepática de glucosa. Los glucocorticoides actúan, al menos en parte, al aumentar la disponibilidad de sustrato con el estímulo de la proteólisis, liberando entonces aminoácidos gluconeogénicos del músculo; también activa de manera directa enzimas

clave en la gluconeogénesis hepática, como la glucosa-6-fosfatasa y la Fosfoenol-Piruvato-Carboxilasa (PEPCK, por sus siglas en inglés), además de aumentar la síntesis de triglicéridos y la oxidación de ácidos grasos (Arnaldi y cols. 2010). En tejido adiposo los glucocorticoides regulan la lipogénesis y lipólisis, estimulando la lipoprotein lipasa y la lipasa sensible a hormonas, favoreciendo la acumulación de grasa en hígado y la ingesta de alimentos, incrementando los niveles de leptina (Vegiopoulos y Herzig 2007).

Los glucocorticoides incrementan el número de leucocitos polimorfonucleares (PMN) mediante tres mecanismos básicos: mayor liberación por la médula ósea, mayor vida media y disminución de su movilidad fuera del compartimiento intravascular. Asimismo, reducen el número de linfocitos, monocitos y eosinófilos circulante., también inducen una menor migración de PMN, monocitos y linfocitos hacia sitios de lesión tisular, lo cual explica el potente efecto antiinflamatorio y la susceptibilidad incrementada a infecciones relacionadas con la administración crónica de glucocorticoides. En el sistema inmunitario, los glucocorticoides inhiben la producción de IL-1 y obstaculizan la síntesis de fosfolipasa A2, una enzima clave en la síntesis de prostaglandinas (Dorantes Cuellar y cols. 2012).

1.3 1 Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y estrés

La respuesta al estrés, se compone de dos vías que interactúan para disminuir el estrés. La primera es la activación del Sistema Medular Adrenal Simpático, con la liberación de catecolaminas (adrenalina y noradrenalina), que es típico durante los períodos de estrés agudo. El segundo componente clave es el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (Yau y Potenza 2013). El eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal es un sistema neuroendocrino con retroalimentación inhibitoria. El estrés estimula la liberación de la neurohormona CRH, desde el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN, por sus siglas en inglés), que a su vez estimula la síntesis de ACTH en la adenohipófisis desencadenando posteriormente la producción de glucocorticoides (cortisol en humanos o corticosterona en roedores) en la corteza adrenal (Yau y Potenza 2013).

La presencia de un estrés agudo con el tiempo altera el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, en consecuencia afecta la homeostasis de energía y la conducta alimentaria, debido a que durante un estrés agudo la liberación de glucocorticoides promueve la movilización de energía, la

gluconeogénesis, los niveles de triglicéridos, y la redirección del flujo de sangre para alimentar los músculos, el corazón y el cerebro. Esto sirve para promover una reacción de lucha o huida inmediata; donde actividades que requieren gasto de energía suelen ser inhibidas. Por lo tanto, parte de la respuesta al estrés agudo incluye la supresión de la ingesta de alimentos (Yau y Potenza 2013). Sin embargo, la presencia de estrés crónico activa al PVN para una mayor liberación de CRH, a su vez, incrementa la liberación de ACTH y de glucocorticoides alterando el metabolismo de la glucosa, promoviendo la resistencia a la insulina, la deposición de grasa abdominal, favoreciendo la presencia de alteraciones metabólicas a largo plazo (Laugero 2004; Yau y Potenza 2013). La noradrenalina y la CRH pueden suprimir el apetito durante el estrés, mientras que el cortisol puede estimular el apetito durante la recuperación del estrés (Yau y Potenza 2013). Cuando se restaura la homeostasis inicia la retroalimentación negativa de glucocorticoides disminuyendo la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, esto sirve para proteger al organismo de la exposición prolongada de glucocorticoides. Al mismo tiempo la liberación de catecolaminas y glucocorticoides inhiben la secreción de las citocinas proinflamatorias, tales como IL-1 β , IL-6, TNF- α , y INF- γ , mientras promuevan la secreción de las citoquinas anti-inflamatorias, tales como IL-4, IL-10 e IL-13 (Tian y cols. 2014), citoquinas que pueden regular a la baja o a la alta la proliferación y la esteroidogénesis adrenal.

Por otro lado, la restricción de alimento actúa como un agente estresante, mientras que el exceso puede suprimir la respuesta al estrés (Laugero y cols. 2002), sin embargo, estos procesos dependerán en gran medida de la composición de la dieta y de la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (Laugero y cols. 2001). En modelos animales se ha observado que dietas ricas en glucosa y sacarosa, proporcionan gran cantidad de sustrato energético que es utilizable inmediatamente en condiciones de estrés (Laugero y cols. 2002), ya que disminuye la respuesta del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal disminuyendo ACTH y corticosterona en plasma (Levin y cols. 2000). En vista de los efectos que tiene el estado nutricional sobre la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, se ha propuesto la participación una hormona importante en la regulación de la homeostasis energética, sobre el control de la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, la leptina, la cual estaría participando en los tres componentes principales del eje, el Hipotálamo, la Hipófisis y la Glándula adrenal (Roubos y cols. 2012).

1.4 Leptina

La leptina es una adipocina (derivado del griego *leptos*, que significa, delgado), es una proteína de 147 aminoácidos y 16 kDa, codificada por el gen (*ob*), localizado en el cromosoma 7q31.3, tiene más que 15.000 pares de bases, y consta de tres exones y dos intrones (Rappaport 2001).

Síntesis. La leptina puede ser transportada a través de la barrera hematoencefálica para entrar en el cerebro, donde se une al receptor largo *ob/Rb* en hipotálamo para provocar una señal de retroalimentación negativo para el control de la homeostasis (Elmqvist y cols. 1998). Por lo tanto, los altos niveles de leptina indican la presencia de suficiente energía, disminuyendo el apetito y aumentando el gasto energético (Ahima y cols. 1996), mientras que una disminución en los niveles de leptina con el inicio de la inanición produce una señal para el inicio de la ingesta alimentaria (Thompson 1996). La secreción de leptina es pulsátil, con ~32 pulsos cada 24 h y una duración 33 minutos por pulso (Malendowicz y cols. 2007). La vida media de la leptina circulante es de 25-70 minutos en los seres humanos (Malendowicz y cols. 2007), de unos 100 minutos en monos (Malendowicz y cols. 2007), de 6-7 minutos en ratas (Malendowicz y cols. 2007), y aproximadamente 50 minutos en ratones (Malendowicz y cols. 2007). Estudios previos muestran que la leptina tiene varias funciones que van desde el control del balance energético, hasta la regulación de procesos fisiológicos como la reproducción, la cognición, el estado de ánimo y las respuestas al estrés (Haque y cols. 2013).

Los niveles circulantes de leptina son generalmente bajos en individuos delgados y aumenta con el incremento en la adiposidad (Ostlund y cols. 1996; Figura 6). También se ha demostrado que los niveles de leptina en suero se asocian directamente con el Índice de Masa Corporal (IMC) (Monti y cols. 2006), y que las personas más obesas tienen altas concentraciones de leptina en su suero y plasma, pero presentan, insensibilidad a la leptina endógena o resistencia a la leptina (Lissner y cols. 1999; Figura 6), que puede ser causado por una disminución en el transporte de leptina en el sistema nervioso central o regulación a la baja de los receptores de leptina (Bjørbaek y cols. 1999; Figura 6). Por el contrario, los niveles séricos de leptina se reducen con el bajo peso y el porcentaje de grasa corporal en los pacientes con anorexia nerviosa en comparación con los pacientes normales (Riccioni y cols. 2003; Figura 6).

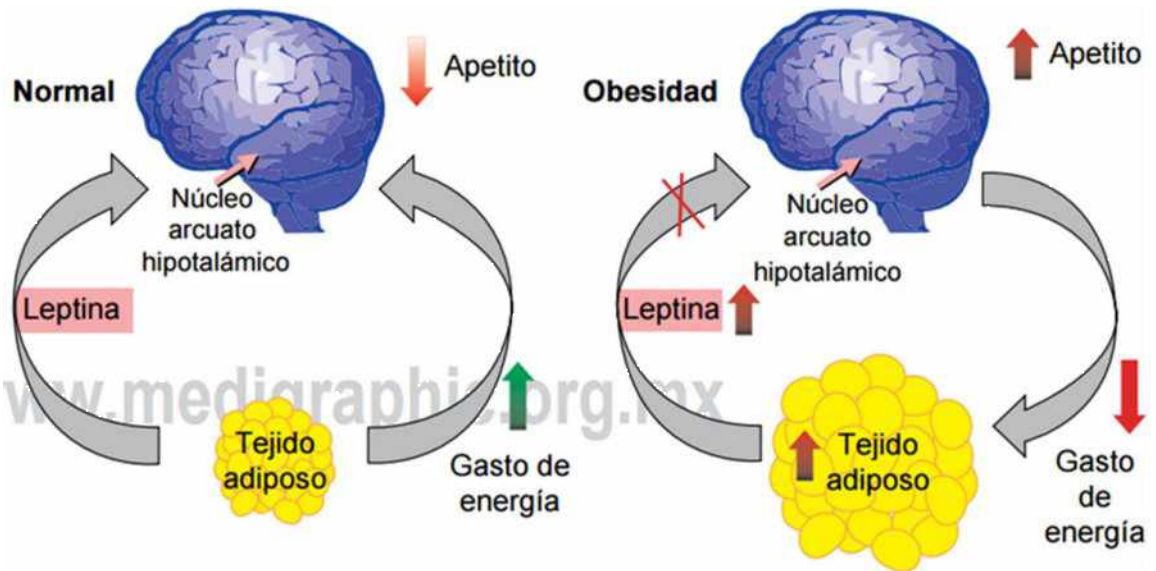


Figura 6. Esquema que ilustra la regulación de los niveles de leptina.

Las diferencias de sexo también modifican las concentraciones de leptina en suero (Paul y cols. 2011), los valores son de tres a cuatro veces más altos en mujeres que en los hombres, la edad también se relaciona con los niveles de leptina, se puede observar una disminución de la leptina en suero en los niños más que en niñas (Ambrosius y cols. 1998), mientras que los hombres de edad avanzada se vuelven progresivamente hiperleptinémicos independientemente de los cambios en la grasa corporal, posiblemente debido a una disminución en los niveles de testosterona (Baumgartner y cols. 1999). En mujeres, los niveles de leptina aumentan (Ryan y cols. 2003) o no se alteran con la edad, especialmente después de ajustar su IMC (Al-Harithy 2004). Los niveles de leptina en suero se correlacionan positivamente con la resistencia a la insulina, independientemente del peso corporal o la adiposidad, tanto en pacientes normoglucémicos, como en pacientes diabéticos (Haffner y cols. 1997). En modelos animales se ha observado que dietas altas en grasa o sacarosa, incrementan los niveles de leptina, acompañados de un incremento en tejido adiposo visceral y obesidad (Bruder-Nascimento y cols. 2013; Diaz-Aguila y cols. 2016).

Mecanismo de acción. Con respecto al receptor de leptina este pertenece a los de la familia de citoquinas clase 1 y también es codificado por el gen *ob*. Se conocen seis isoformas del mismo. De ellos se destaca el llamado *ob/Ra* (forma corta) está ubicado en el plexo coroideo y transfiere a la leptina al Líquido Cefalorraquídeo y al Sistema Nervioso Central, aunque este

predomina en los tejidos periféricos, y otro el ob/Rb (forma larga) que se expresa ampliamente en el hipotálamo donde se encarga específicamente de la transmisión de la señal, estando su función asociada a la conducta alimentaria y al balance energético (Rappaport 2001; Malendowicz y cols. 2007). También se ha encontrado una isoforma soluble extracelular (ob/Re) la cual pierde su dominio intracelular. Estos receptores presentan tres dominios: 1) El ligando extracelular con 840 aminoácidos. 2) El segundo dominio transmembrana con 34 aminoácidos. 3) Un tercer dominio variable con una forma corta (Ra) de 34 aminoácidos y otra larga (Rb) de 304 aminoácidos relacionados con la janoproteinkinasa y de la transmisión de señales con el concurso de los sistemas STAT (Malendowicz y cols. 2007). Se admite la existencia confirmada de receptores de leptina además de sus localizaciones dominantes en plexo coroideo e Hipotálamo (núcleos supraquiasmático, arcuato, paraventricular, mamilar, dorsomedial, supraóptico y núcleo posterior), así como también en tejidos extracerebrales como hígado, pulmón, corazón, testículo, ovarios, riñón, bazo, tejido adiposo (Rappaport 2001). Después de su secreción de los adipocitos, la leptina circula por el obligado a ob/Re en sangre, actuando como un marcador de la energía total del cuerpo almacenada en la grasa y en segundo lugar como marcador de los cambios agudos en la ingesta de energía. Una vez que llega a la barrea hematoencefalica con ayuda de la isoforma ob/Ra atraviesa al hipotálamo donde media la mayoría de sus acciones. Más específicamente, actúa sobre los nucleos supraóptico, paraventricular, periventricular, arqueado, y el hipotálamo lateral. Allí, interactúa con un circuito complejo, para la activación de las neuronas que sintetizan péptidos anorexígenicos, al mismo tiempo suprime la actividad de las neuronas orexígenicos, que expresan péptidos relacionados con agouti (AgRP, por sus siglas en inglés) y neuropéptido Y (NPY, por sus siglas en inglés) (Triantafyllou y cols. 2016).

En humanos, la leptina es importante para el inicio de la pubertad y la etapa reproductiva a través la estimulación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) (Michalakis y cols. 2013). Ratones deficientes de leptina (ob/ob) o del receptor de leptina (db/db), presentan bajas concentraciones de gonadotropina e incompleto desarrollo de los órganos reproductivos (Donato y cols. 2011); pero, la administración de leptina, estimula el crecimiento celular endotelial y favorece la respuesta angiogénica a través del factor de

crecimiento de fibroblastos-2 (FGF-2, por sus siglas en inglés) y del VEGF (Cao y cols. 2001). Por otro lado, la leptina inhibe la secreción de insulina estimulada por glucosa en islotes pancreáticos (Ahrén y Havel 1999), reduce el mRNA de la preproinsulina en células beta del páncreas (Seufert y cols. 1999), mientras que las concentraciones basales de leptina e insulina son paralelas entre sí (Pelleymounter y cols. 1995). Estudios previos, han demostrado que la leptina regula la respuesta inmune, la respuesta innata y adaptativa, tanto en condiciones normales y patológicas. Una disminución de leptina favorece la susceptibilidad a infecciones. Por el contrario, enfermedades autoinmunes se asocian con aumento de la secreción de la leptina y la producción de citoquinas proinflamatorias (Fernandez-Riejos y cols. 2010).

La leptina tiene acciones sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Tiroides, regulando a la hormona pro-liberadora de tirotrópina (TRH, por sus siglas en inglés) y la expresión de genes que induce la conversión de proTRH a la TRH, del mismo modo, la leptina participa en la regulación del eje Hipotálamo-Hipófisis- adrenal, sin embargo esta relación aun no es del todo clara y parece diferir entre las especies (Triantafyllou y cols. 2016). La leptina, además de regular la ingesta de alimento y el gasto energético a través de sus receptores en el hipotálamo (Roubos y cols. 2012), también puede regular la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal. En pacientes obesos no se ha observado una correlación entre los niveles de cortisol y los niveles de leptina (Goodson y cols. 2014); pero, en modelos animales, se ha evidenciado que la leptina aumenta la producción de CRH en el núcleo paraventricular, incrementa la síntesis de glucocorticoides en la glándula adrenal, modifica la presencia de receptores de glucocorticoides en hipocampo e hipotálamo favoreciendo la síntesis de epinefrina y norepinefrina en la medula adrenal, catecolaminas involucradas en la respuesta al estrés (Trevanzoli y cols. 2010). Sin embargo, existen datos contradictorios, estudios *in vitro*, han mostrado que la leptina reduce la secreción de cortisol basal y bloquea el aumento de cortisol inducido por la secreción de ACTH en células adrenocorticales de bovinos (Bornstein y cols. 1997), sugiriendo que los efectos de la leptina circulante sobre los niveles plasmáticos de glucocorticoides puede ser, en parte, mediada por una acción directa sobre la esteroidogénesis adrenal. Mientras que en células adrenocorticales humanas, la inhibición de cortisol por leptina no fue medida (Pralong y cols. 1998).

A nivel periférico, la administración de leptina en rata macho durante la lactancia, aumenta las concentraciones de catecolaminas y en edad adulta la cantidad catecolaminas se triplica (Trevenzoli y cols., 2007). En hembras adultas, disminuye el peso de la glándula adrenal, el volumen y número de células de la zona fascicular, además de la concentración sanguínea de ACTH y corticosterona (Malendowicz y cols. 2007), sugiriendo, que la hiperleptinemia en edad temprana, aumenta la función adreno-medular en edad adulta, y que la administración prolongada de leptina, ejerce una potente acción supresora en el crecimiento y la capacidad de secreción de glucocorticoides de la corteza suprarrenal en la rata. Los estudios sobre el papel de la leptina en funcionamiento eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, sugieren que la relación entre la leptina y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal es bidireccional. En condiciones potencialmente amenazantes, las hormonas peptídicas provocan un fuerte control de retroalimentación sobre la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (Haque y cols. 2013). Por el contrario, en condiciones fisiológicas normales, la leptina ejerce un efecto tónico sobre la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.

2 ANTECEDENTES

2.1 Modelos animales

2.1.1 Consumo de sacarosa

Los pacientes obesos se caracterizan por un incremento en el tejido adiposo visceral, así como la presencia de hiperfagia, resistencia a la insulina y a la leptina (Malik y cols. 2010). Uno de los factores que pueden contribuir a la hiperfagia en estos pacientes, es la leptina, ya que ratones que carecen de leptina (ob/ob) o no cuentan con la presencia de receptores de leptina (db/db) sufren de hiperfagia y obesidad (Zhou y Rui 2013). Algo similar sucede en ratas que consumen dietas altas en sacarosa donde disminuyen su consumo de alimento, sin modificar el peso corporal, incrementando la acumulación de grasa visceral y aumentando las concentraciones de leptina (Corona-Pérez 2013; Díaz-Aguila y cols. 2016).

Aunque en pacientes obesos los niveles de cortisol son contradictorios (Kjölhede y cols. 2014; Reinehr y cols. 2014), en modelos animales la concentración de corticosterona no se afecta por la ingesta de sacarosa (Díaz-Aguila y cols. 2016). Cabe resaltar que la ingestión de sacarosa en ratas restablece el balance energético y la expresión del factor liberador de la corticotropina, pareciera que la retroalimentación de los glucocorticoides no es una consecuencia directa de las acciones de las hormonas sobre el cerebro, sino una consecuencia de las acciones metabólicas de los glucocorticoides (Laugero 2004). Aunado a esto, también se han observado alteraciones histológicas, presencia de colágeno e incremento de gotas lipicas en la glándula adrenal en animales que consumen sacarosa (Martinez-Calejman y cols. 2012; Díaz-Aguila y cols. 2016).

2.1.2 Estrés

En modelos animales el estrés crónico disminuye la ingesta de alimento, la ganancia de peso corporal, aumenta los niveles de progesterona así como las de corticosterona acompañado de una disminución de la testosterona, disminuye el índice de proliferación de la glándula adrenal, el espesor de la zona fascicular acompañada de un incremento en la zona reticular (Macedo y cols. 2012; Bruder-Nascimento y cols. 2013), mientras que el estrés agudo, aumentan las concentraciones de ACTH, corticosterona (Ricarte-Jané y cols. 2002), disminuye el peso de la glándula adrenal, las gotas lipídicas de la zona fascicular, el área de los vasos sanguíneos de la

zona reticular acompañado de fibrosis (Koko y cols. 2004), sugiriendo que estas alteraciones son dependientes del tipo de estrés (crónico o agudo), y de la duración del mismo.

2.1.3 Leptina

El papel de la leptina sobre el funcionamiento del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal surgió porque en ratones deficientes de leptina (ob/ob) se observaba una hipercorticosteronemia (Sliker y cols. 1996) y la administración crónica de leptina corregía la hipercorticosteronemia (Stephens y cols. 1995; Arvaniti y cols. 1998). La hiperactividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal también se observó en ratones con mutaciones en el receptor de leptina (db/db) (Chen y cols. 1996), pero la hipersecreción de corticosterona en ratones db/db no era corregida por la administración de leptina, lo que sugirió que el funcionamiento normal de los receptores de leptina es esencial para la expresión de su efecto sobre el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.

La importancia fisiológica de esta influencia inhibitoria de la leptina en la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, también se estableció porque el aumento de ACTH y corticosterona en plasma inducido por el ayuno en ratones de tipo salvaje, fue bloqueado por una inyección de leptina (Ahima y cols. 1996). La evidencia sugiere que los efectos inhibidores de la leptina sobre la liberación de ACTH y corticosterona fueron mediados por receptores en el hipotálamo, sin descartar la posibilidad de que los efectos de la leptina sobre los niveles de corticosterona fueron también, en parte, mediada por receptores en las glándulas adrenales (Ahima y cols. 1996).

Posteriormente en estudios *in vitro*, se observó que la leptina reduce la secreción de cortisol basal y bloquea el aumento de cortisol inducido por la secreción de ACTH en células adrenocorticales de bovinos (Bornstein y cols. 1997), sugiriendo que los efectos de la leptina circulante sobre los niveles plasmáticos de glucocorticoides puede ser, en parte, mediada por una acción directa sobre la esteroidogénesis adrenal. Mientras que en células adrenocorticales humanas, estimuladas con ACTH para la liberación de cortisol, la inhibición de cortisol por leptina no fue medida (Pralong y cols. 1998).

A nivel periférico, la administración de leptina en rata macho durante la lactancia, aumenta las concentraciones de catecolaminas y en edad adulta la cantidad catecolaminas se

triplica (Trevenzoli y cols., 2007). En hembras adultas, disminuye el peso de la glándula adrenal, el volumen y número de células de la zona fascicular, además de la concentración sanguínea de ACTH y corticosterona (Malendowicz y cols. 2007). Estos estudios sugirieron que la leptina puede actuar centralmente a nivel de hipotálamo o periféricamente a nivel de la glándula adrenal para provocar un importante control de retroalimentación sobre la liberación de glucocorticoides.

Pero en situaciones de estrés, ¿cómo se regula la concentración de leptina? En roedores con estrés moderado, se ha observado un aumento en los niveles de leptina. Sin embargo, si se administra leptina antes del estrés, disminuye la concentración de corticosterona y CRH sin afectar los niveles de leptina. Concluyendo que la leptina inhibe la liberación de CRH afectado el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal en respuesta al estrés (Heiman y cols. 1997). Estudios posteriores también han mostrado que la leptina reduce significativamente la expresión de CRH en el Núcleo Paraventricular inducida por el estrés (Oates y cols. 2000), incrementa los niveles de ACTH 2-4 hrs después de la presencia de estrés, sin alterar los niveles de corticosterona (Konishi y cols. 2006), debido a que el aumento de CRH, ACTH y cortisol son mitigados por la leptina. Se sugirió que la leptina disminuye la respuesta neuroendocrina mediante la mejora de la retroalimentación negativa de glucocorticoides. Además, de que una hiperleptinemia es un factor independiente para el desarrollo de enfermedades cardiovascular y un predictor de infarto (Karbowska y Kochan 2012). A partir de los estudios mencionados anteriormente, se puede especular que un aumento en la actividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal durante la exposición a un factor de estrés se asocia con una disminución correspondiente en la liberación de leptina.

En particular ratas expuestas a estrés agudo muestran un aumento en los niveles circulantes tanto de corticosterona como de leptina (Zareian y cols. 2011). Por otro lado, un estrés crónico por inmovilización aumenta los niveles circulantes de corticosterona, pero disminuye los niveles de leptina (de Oliveira y cols. 2013), o no afecta los niveles de leptina (Bruder-Nascimento y cols. 2013). El aislamiento en el período prepuberal no ejerce ningún efecto sobre los niveles de leptina (Arcego y cols. 2014). El estrés psicológico crónico incrementa la corticosterona circulante en ratones dominante más que en ratones subordinados, pero la leptina incrementa en ratones subordinados y disminuye en ratones dominantes (Sanghez y cols. 2013).

La hiperactividad del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal inducida por el estrés leve crónico en ratas se asoció con una disminución de los niveles séricos de leptina y la expresión del ARNm del receptor de leptina hipotalámico (Ge y cols. 2013).

Estudios realizados por Haque y cols., (2013) mostraron que los aumentos de corticosterona por el estrés en ratas con inmovilización disminuyen cuando se administra 0.1 mg/kg de leptina y, si son sometidos a 2 hrs de inmovilización la corticosterona disminuye inmediatamente después de la inyección de leptina. La concentración de corticosterona era completamente bloqueada en animales inyectados con una dosis mayor de leptina (0.5 mg/kg), pero los niveles no disminuyeron por debajo de los niveles basales observados en los animales no estresados. Como podemos observar la acción de la leptina sobre las funciones o arquitectura de la glándula adrenal, son dependientes del tipo, tiempo, edad y sexo en el que se aplique el estrés.

2.1.4 Dietas ricas en carbohidratos, leptina y estrés

Son pocos los estudios que evalúan la interacción de la dieta, la leptina, los glucocorticoides y el estrés, y los estudios que existen se centran en el análisis del efecto del estrés, la dieta, la leptina y los glucocorticoides de manera individual y en edad adulta. De manera particular durante la niñez y la adolescencia un hiper o hipo funcionamiento del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal pueden tener efectos permanente sobre el desarrollo de sistemas endocrinos y metabólicos en edad adulta (Charmandari y cols. 2003), teniendo en cuenta que estos periodos críticos están caracterizados por el aumento en la vulnerabilidad de los factores estresantes (Charmandari y cols. 2003).

3 JUSTIFICACIÓN

Los niños y adolescentes son los principales consumidores de bebidas endulzadas con azúcar (Powell y Nguyen 2013). Este alto consumo se asocia con un aumento en la prevalencia de los componentes del Síndrome Metabólico (Silveira y cols. 2014; Stern y cols. 2014). Del mismo modo, las poblaciones jóvenes tienen una glándula adrenal inmadura y cambiante (Mouritsen y cols. 2014) que puede afectar a la respuesta al estrés y también aumentar la predisposición a padecer enfermedades metabólicas en la edad adulta. En la actualidad se ha relacionado el desarrollo de Síndrome Metabólico con la presencia de estrés crónico. Con respecto a esto se sabe que la exposición a eventos estresantes, en la niñez o adolescencia, puede afectar la pubertad, la composición corporal, así como el desarrollo de obesidad, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2 (Vanaelst y cols. 2012). Mientras que en edad adulta, se sabe que México es el país con más alto índice de estrés en edad adulta, debido a que de los 75 mil infartos que se registran al año, el 25% está asociado a enfermedades derivadas del cansancio y la presión del trabajo según la Organización Mundial de la Salud (OMS).

En modelos animales, se ha mostrado que una dieta rica en sacarosa o enriquecida con alta fructosa estimulan la aparición de los componentes asociados con el Síndrome Metabólico, incluyendo el aumento de la acumulación de grasa visceral y una concentración sérica elevada de insulina y triglicéridos (Stanhope y Havel 2008). Además, una dieta alta en sacarosa durante la infancia también promueve alteraciones metabólicas en función de la hora y la duración de la exposición (Fuente-Martin y cols. 2012). Sin embargo la información sobre este tema sigue siendo escasa y más estudios centrados en el análisis de los efectos de una dieta rica en azúcar en el funcionamiento de diversos órganos metabólicos son necesarios. Las glándulas adrenales secretan hormonas relevantes que intervienen en el metabolismo, la regulación de la presión arterial, y homeostasis de la glucosa (De Silva y Wijesiriwardene 2007). Una dieta rica en sacarosa promueve la alteración histológica de las glándulas adrenales en ratas macho adultas asociadas con indicadores del Síndrome Metabólico (Martínez-Calejman y cols. 2012). El alto consumo de sacarosa en la vida temprana altera la morfología de las zonas de la corteza suprarrenal que conducen a cambios asociados con el Síndrome Metabólico en ratas adultas (Díaz-Aguila y cols. 2016). Además, se encontró que el consumo de azúcar reduce los niveles de corticosterona en el

suero y la actividad de la enzima 11-beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa hepática, coincidiendo con una respuesta de estrés reducida (Corona-Pérez y cols. 2015). La síntesis de esteroides en células adrenales también se ve afectada por el consumo de sacarosa elevada (Astor y cols. 2009). El estrés crónico en ratas adultas produce hipertrofia o hiperplasia de la ZF y una infiltración importante de leucocitos (Jennewein y cols. 2015), que se ha asociado con los niveles de corticosterona elevadas inducidas por la hormona ACTH (Ulrich-Lai y cols. 2006). No obstante, actualmente se desconoce si la ingesta de azúcar y el estrés puede afectar las características morfométricas de las glándulas adrenales en animales jóvenes. Por lo tanto, el presente estudio tuvo como objetivo evaluar críticamente la morfología de las diferentes zonas de la corteza adrenal, así como la presencia de células inmunoresponsivas en las glándulas adrenales de ratas jóvenes expuestas a estrés y alimentados con sacarosa.

4 HIPÓTESIS

El consumo de sacarosa durante la infancia, adolescencia y en edad adulta más estrés por restricción aumentan las concentraciones de leptina, corticosterona y modifica la histológica de la glándula adrenal en ratas machos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar si el consumo de sacarosa durante la infancia, adolescencia y en edad adulta más estrés por restricción afecta las concentraciones de leptina, corticosterona y modifica la histológica de la glándula adrenal de ratas machos.

5.2 Objetivos específicos (en función del tiempo, consumo de sacarosa y el estrés)

- a) Determinar la concentración de corticosterona y leptina
- b) Evaluar el arreglo histológico en la glándula adrenal
- c) Determinar el área de los vasos sanguíneos de la Zona Reticular y Médula
- d) Cuantificar el número de células polimorfonucleares infiltradas en los vasos sanguíneos de la Zona Reticular y Médula
- e) Cuantificar el número de células positivas a Ki-67

6 MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Manejo de los animales

Se utilizaron 96 ratas machos de la cepa Wistar de 21 días de edad mantenidas en condiciones de bioterio, con un fotoperiodo de 12/12 hrs, con ciclo luz-oscuridad invertido y temperatura de 20 ± 2 °C, con alimento y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a la regulación establecida en el Manual de Seguridad en el trabajo de laboratorio del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta y en la Norma Oficial Mexicana en el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio NOM-062ZOO-1999. El protocolo de investigación fue revisado y aprobado por el comité de Bioética del Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta.

6.2 Grupos experimentales

Las ratas se asignaron al azar a los siguientes grupos (n=8, cada uno): control (C), el estrés crónico por restricción (St), dieta alta en sacarosa (S30), y estrés crónico por restricción más dieta alta en sacarosa (St/S30), durante uno, dos y tres meses; donde los grupos C y St, no consumieron agua con sacarosa por uno, dos y tres meses, además los grupos St y St/S30 fueron expuestas a estrés un mes previo al sacrificio, ver diseño experimental (Figura 7).

6.3 Protocolo de la dieta

Todas las ratas fueron alimentadas con dieta normal Chow 5001 de Purina (Tabla 1). Los grupos experimentales recibieron 30% de sacarosa estándar comercial en el agua que consumen, las ratas del grupo control consumieron agua simple. Durante el período de experimental, se hizo el registro diario del peso corporal, consumo de alimento y agua. El consumo de alimento y agua fue medido colocando una cantidad conocida en cada jaula obteniendo la cantidad remanente 24 horas después. La ingesta total de calorías se determinó a partir de la cantidad de alimento ingerido (calculado como g/100g de peso corporal x 3.3kcal/g de alimento) y el consumo de sacarosa (evaluado como ml de agua/100g peso corporal x g de azúcar/mL de agua x 4 cal/g de azúcar).

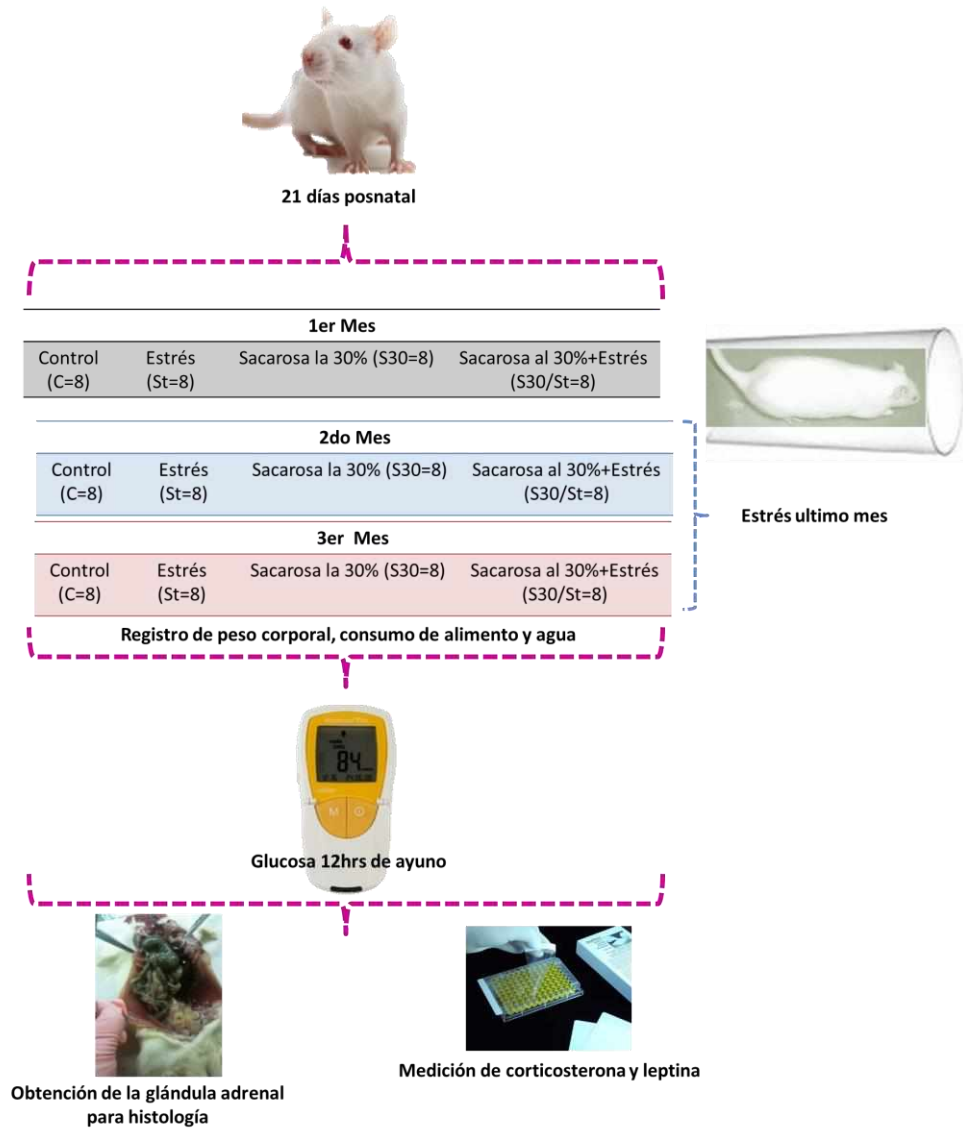


Figura 7. Diseño experimental. Grupo control (C), Estrés (St); sacarosa al 30% (S30); sacarosa al 30% más estrés (S30/St); (n=6-8/grupo).

DIETA CONTROL (CHOW 5001 PURINA)		
Nutrimiento	Porcentaje (%)	Kcal/100g
Proteínas	29	98.6
Lípidos	13	44.2
Carbohidratos	58	197.2
Total	100	340

Tabla 1. Aporte calórico y nutrimental de alimento de dieta Chow 5001 de Purina.

6.4 Inducción de estrés

Para someter las ratas a estrés, se colocaron en tubos de plástico de diferentes tamaños, fijados con cinta adhesiva en el exterior, un extremo se mantuvo abierto para que la rata pudiera respirar, las ratas de un mes fueron expuestas a 1 hora diaria de estrés por la mañana (11:00 a.m.) durante 5 días a la semana hasta concluir el experimento (sin estrés los fines de semana) (Macedo y cols. 2012). Las ratas de dos y tres meses utilizaron el mismo procedimiento solo que estas fueron sometidas a estrés el último mes del experimento para evitar la adaptación.

6.5 Obtención de muestras sanguíneas, glándula adrenal y tejido adiposo

Al término de cada experimento, previo al sacrificio, las ratas de cada grupo se dejaron en ayuno para lo cual se les quitó el alimento a las ocho de la noche y las ratas que recibieron 30% de sacarosa se les retiró colocando agua simple para cumplir un ayuno de doce horas, al día siguiente a las ocho de la mañana a cada rata se le midió la glucosa sérica con un analizador Accutrend GCT, Roche Diagnostics. Inmediatamente después, los animales fueron sacrificados por decapitación para coleccionar dos tubos (13 x 100mm). La sangre se dejó reposar en baño maría durante 15 minutos, después se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. El suero fue separado haciendo alícuotas de 300 μ L, las cuales se conservaron en congelación a -70°C hasta el análisis de corticosterona y leptina. La rata decapitada se colocó en posición supina, se realizó una incisión longitudinal sobre la línea media ventral, desde la cavidad abdominal hasta el dorsal del pene. La glándula adrenal y el tejido adiposo fueron extraídos y pesados.

6.6 Determinación de corticosterona y leptina

El análisis de corticosterona y de leptina en suero, se realizó por el método de ELISA (Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay). El análisis de corticosterona se realizó por medio de kits disponible comercialmente, Kit Enzyme Immunoassay, compañía Assay Desing No.900-097, el coeficiente de variación intra- e inter-ensayo fue 2.1 pg/mL y 5.3 pg/mL, respectivamente. Y para el análisis de leptina sanguínea se realizó por medio de kits disponible comercialmente, Kit Enzyme Immunoassay, compañía Cayman No.10007609. Los estándares y las muestras se corrieron por duplicado.

6.7 Análisis histológico de la glándula adrenal

Las glándulas adrenales se fijaron en Bouin's-Duboscq durante 24 hrs. Posteriormente, el tejido se deshidrato con alcohol etílico en concentraciones ascendentes (60, 70, 80, 96 y 100%), se acalaro en xileno para infiltrarlo e incluirlo en paraplast-Xtra. Se obtuvieron cortes histológicos transversales de 7µm de espesor (16 de cada animal glándula derecha e izquierda) con un micrótopo, los cuales se colocaron en dos portaobjetos, ocho cortes por laminilla. La primera laminilla fue teñida con hematoxilina eosina (tiñe citoplasma y núcleo). La segunda laminilla fue teñida con Tricrómica de Masson (tiñe colágeno y vasos sanguíneos), para determinar el grado de fibrosis. La tercera laminilla fue teñida con colorante de Wright para contabilizar células del sistema inmune. Se tomaron microfotografías con una cámara OLYMPUS de 5.1 mega píxeles, montada en un microscopio óptico Zeiss Imager A.1 (a 4, 10, 40 y 100 aumentos totales). En los cortes histológicos se midió el grosor de las zonas glomerular, fascicular y reticular (Figura 8A), así como el área de la médula adrenal (Figura 8B) usando el software de imágenes Axio Vision Rel 4.6 (Zeiss). También en las cuatro zonas de las glándulas adrenales se cuantificaron el número de células y área ocupada por células utilizando una cuadrícula con 20 cuadrados de 4 X 4 colocada en la pantalla del ordenador, pero contabilizando sólo los cuatro cuadrados centrales (14 mm²) (Figura 8C).

Ier mes. Para la glándula adrenal derecha se contaron y midieron aproximadamente 1356 células y 1471 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo C; 2086 células en la glándula adrenal derecha y 2008 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo St; 1473 células en la glándula adrenal derecha y 1543 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo S30; y 2172

células en la glándula adrenal derecha y 2300 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo S30/S30.

2do mes. Para la glándula adrenal derecha se contaron y midieron aproximadamente 1326 células y 1364 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo C; 1914 células en la glándula adrenal derecha, y 1354 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo St; 1196 células en la glándula adrenal derecha, y 1318 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo S30; y 1505 células en la glándula adrenal derecha, y 1185 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo St/S30.

3er mes. Para la glándula adrenal derecha se contaron y midieron aproximadamente 1184 células y 1072 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo C; 2077 células en la glándula adrenal derecha, y 2108 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo St; 1050 células en la glándula adrenal derecha, y 974 células en la glándula adrenal izquierda en el S30; y 1804 células en la glándula adrenal derecha, y 1850 células en la glándula adrenal izquierda en el grupo St/S30.

6.7.1 Área de los vasos sanguíneos

Se tomaron microfotografías de las laminillas teñidas con hematoxilina eosina, con un aumento de 1000x de la zona reticular y medular de cada glándula adrenal. Para la zona reticular se realizó la medición del área de los vasos sanguíneos presentes en esta zona, teniendo de referencia los cuatro puntos cardinales, mientras que para la médula se midió el área de todos los vasos sanguíneos.

6.7.2 Conteo de células inmunes

Se tomaron microfotografías de los cortes teñidos con colorante de Wright, con un aumento de 1000x para contabilizar células inmunes en los vasos sanguíneos presentes en las cuatro zonas de las glándulas adrenales (zona glomerular, fascicular, reticular, y médula adrenal), teniendo de referencia los cuatro puntos cardinales, mientras que para la médula se tomaron de referencia vasos sanguíneos centrales.

6.7.3 Proliferación celular

Otra serie de cortes fueron desparafinados e incubados posteriormente en citrato sódico a 10 mM con un pH 6 por tres noches. Las peroxidases endógenas fueron bloqueadas con peróxido de hidrogeno (0.3%) durante 30 minutos. Posteriormente se lavaron con buffer de fosfatos salino (PBS) y los sitios de unión inespecífica para anticuerpos secundarios se bloquearon con de suero normal de cabra al 5% (NGS) diluido en PBS con 0,3% Triton X-100 (PBST) por 1hora. Los portaobjetos se incubaron con el anticuerpo primario Ki-67 (1: 100) diluido en PBST durante 24 horas a 4 ° C. Posteriormente, se lavaron con PBST y se incubaron con anticuerpo secundario (anti-IgM de ratón para el anti-Ki67) diluido en PBST durante 2 horas a 37 ° C y después se lavaron con PBS, posteriormente se incubó con avidina y reveló con Diaminobencidina (DAB, 1:20). Las láminas fueron cubiertas con resina como medio de montaje y fue colocado un cubreobjeto, se observaron bajo el microscopio y se tomaron microfotografías. Algunas secciones se contratiñeron con hematoxilina de Mayer. En otros, el anticuerpo primario se omitió para ser utilizados como controles negativos. Las fotomicrografías se tomaron a 1000x tomando de referencia los cuatro puntos cardinales, se tomaron tres secciones por zona para calcular el porcentaje de células positivas y negativas. Se utilizaron 100 a 120 células para cada zona y por rata para calcular la proporción de inmunoreactividad de células anti-Ki-67 en las glándulas adrenales. Las células con al menos un núcleo positivo fueron considerados como anti-Ki-67 positivo.

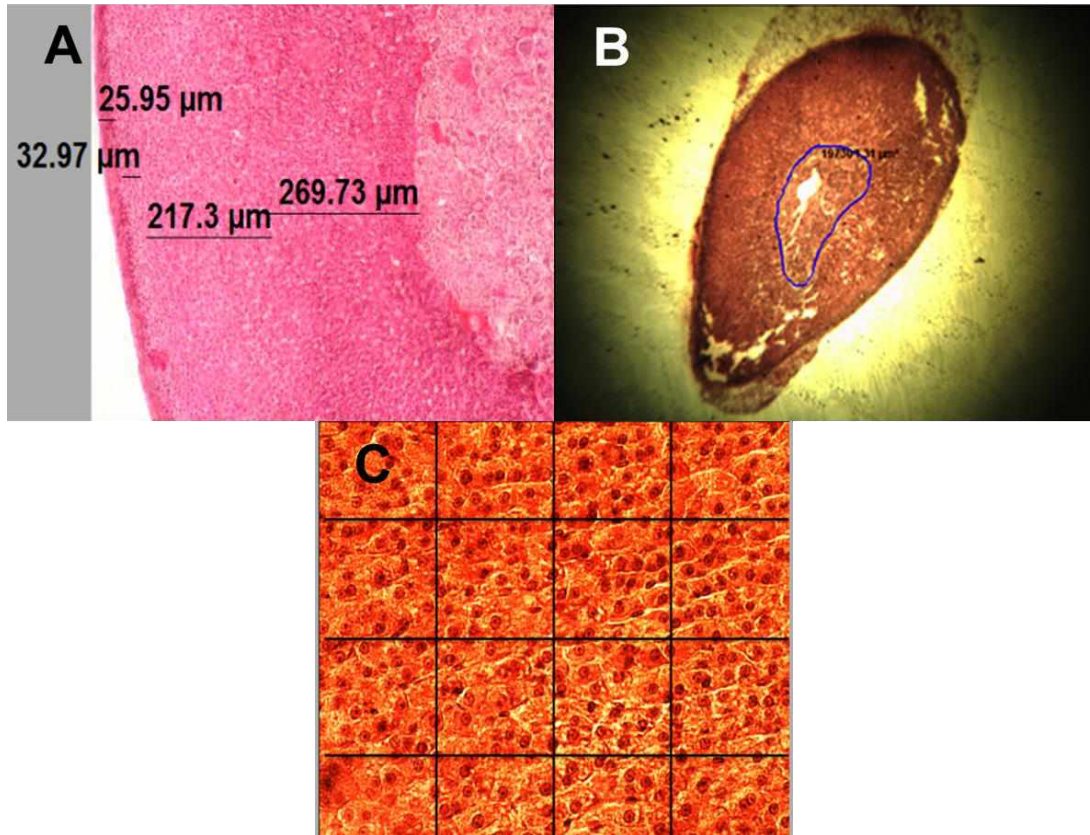


Figura 8. A) Espesor de las zonas de la glándula adrenal. B) Determinación de área de la médula adrenal. C) Número y área de las células de la corteza y médula adrenal

6.8 Análisis estadístico

El número de mediciones en nuestro estudio vario de 6-8 animales por grupo, en función de las variables y debido a las dificultades en el procesamiento de técnicas. Todas las variables representan la media \pm e.e. Los datos se analizaron con una ANOVA de dos vías y Newman-Keuls como prueba post-hoc para observar las diferencias entre grupos. Para el porcentaje de células se realizó una prueba de Chi-cuadrada seguida de una prueba de Fisher. Finalmente para observar los cambios de las variables con respecto al tiempo se hizo una ANOVA de una vía y Dunn's (Bonferroni) Correction como prueba post-hoc. En todos los casos, $p < 0.05$ fue aceptada como estadísticamente significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GB-STAT V6.0 para Windows.

7 RESULTADOS

7.1 Primer mes

7.1.1 Parámetros de crecimiento

Aunque el estrés crónico mostró diferencias en el peso corporal (estrés crónico, $F_{(1,1,31)} = 4.64$, $p < 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,31)} = 1.29$, $p > 0.05$; interacción, $F_{(1,1,31)} = 0.11$, $p > 0.05$; Tabla 2) no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. El estrés crónico no disminuye la ingesta de alimento ($F_{(1,1,31)} = 0.06$, $p > 0.05$; Tabla 2). Sin embargo, el grupo S30 ingirió menos alimento sólido que el grupo C, y el grupo S30/St ingiere menos alimento que el grupo St ($F_{(1,1,31)} = 107.17$, $p < 0.05$; Tabla 2), sin observar cambios por la interacción de ambos factores ($F_{(1,1,31)} = 0.60$, $p > 0.05$; Tabla 2). La ingesta de agua no fue afectada por el estrés crónico ($F_{(1,1,31)} = 1.83$, $p > 0.05$), pero el grupo S30 ingiere más agua, que los grupos C, St, y S30/St (dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,31)} = 11.47$, $p < 0.05$; Tabla 2) sin observar cambios por la interacción de ambos factores ($F_{(1,1,31)} = 0.93$, $p > 0.05$; Tabla 2). En consecuencia, el estrés crónico no afecta la ingesta calórica total ($F_{(1,1,31)} = 1.11$, $p > 0.05$; Tabla 2), fue mayor la ingesta calórica total en los grupos S30 y S30/St, con respecto a los grupos C y St (dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,31)} = 120.26$, $p < 0.05$; Tabla 2) sin observar cambios por la interacción de ambos factores ($F_{(1,1,31)} = 0.04$, $p > 0.05$; Tabla 2). Los niveles de glucosa no se vieron afectados por el estrés crónico ($F_{(1,1,31)} = 1.29$, $p > 0.05$), la dieta alta en sacarosa ($F_{(1,1,31)} = 0.47$; $p > 0.05$), o la interacción de ambos factores ($F_{(1,1,31)} = 0.96$; $p > 0.05$; Tabla 2).

7.1.2 Adiposo Visceral

Aunque el estrés crónico no modifica el índice de adiposidad ($F_{(1,1,31)} = 4.75$, $p > 0.05$). La dieta alta en sacarosa incrementa el tejido adiposo visceral ($F_{(1,1,31)} = 8.16$, $p < 0.05$), sin observar modificaciones por la interacción entre ambos factores ($F_{(1,1,31)} = 0.02$, $p > 0.05$; Figura 9A). Resultados similares se observaron con el tejido adiposo visceral (estrés crónico, $F_{(1,1,31)} = 1.37$, $p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,31)} = 8.68$, $p < 0.05$; interacción, $F_{(1,1,31)} = 0.60$, $p > 0.05$; Figura 9B).

Parámetros	C	St	S30	S30/St
Ganancia de peso corporal (g)	129 ±9 ^a	112 ±8 ^a	122 ±8 ^a	98 ±12 ^a
Ingesta de alimento (g/día/100g Peso Corporal)	11 ±0.5 ^a	10 ±0.5 ^a	6 ±0.2 ^b	6 ±0.4 ^b
Ingesta de agua (mL/día/100g Peso Corporal)	25 ±2 ^a	25 ±1 ^a	31 ±1 ^b	28 ±1 ^a
Ingesta calórica (kcal)	37 ±2 ^a	35 ±2 ^a	56 ±1 ^b	54 ±2 ^b
Glucosa (mg/dL)	112 ±7 ^a	90 ±14 ^a	109 ±3 ^a	107 ±13 ^a

Tabla 2. Ganancia de peso corporal, ingesta de alimento y agua, ingesta calórica y glucosa. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p<0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo)

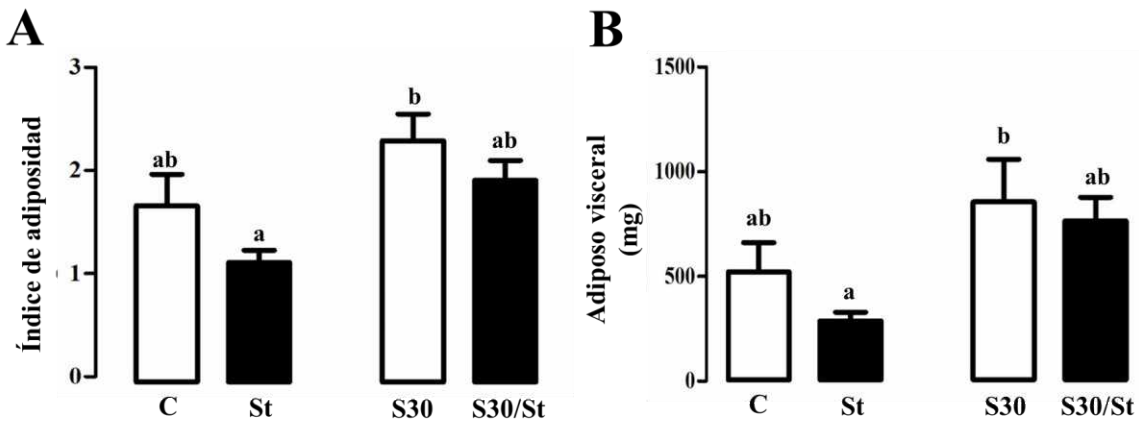


Figura 9. A) Índice de adiposidad y B) tejido adiposo visceral. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p<0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo).

7.1.3 Peso y características histológicas de la glándula adrenal

Peso de la glándula adrenal: El peso de la glándula adrenal derecha del grupo S30/St fue mayor en comparación a los grupos C, St y S30 (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 4.30, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 5.59, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 12.41, p < 0.05$; Figura 10A). El peso de la glándula adrenal izquierda no fue afectado por el estrés crónico ($F_{(1, 1, 31)} = 4.77, p > 0.05$), o por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1, 1, 31)} = 0.43; p > 0.05$), o la interacción entre ambos factores ($F_{(1, 1, 31)} = 0.03, p > 0.05$; Figura 10B).

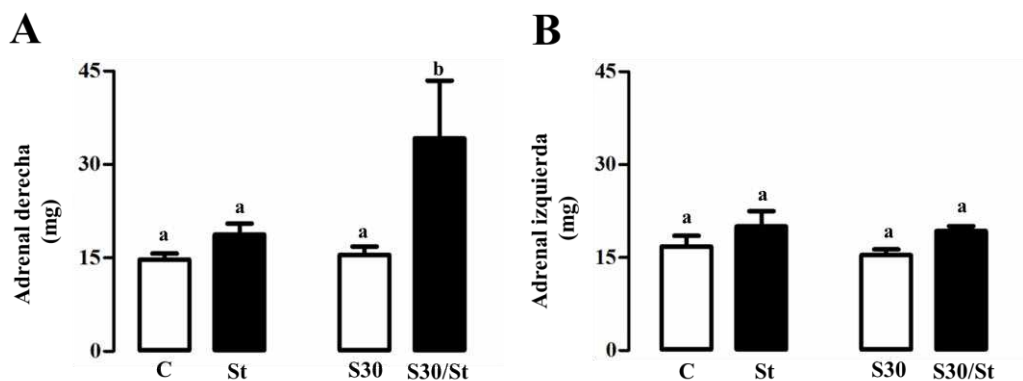


Figura 10. Peso de las glándulas adrenales derecha (A) e izquierda (B) al primer mes. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, Anova dos vías Newman-Keuls post-hoc. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo).

7.1.3.1 Características histológicas de la glándula adrenal

Los núcleos y citoplasma de las células de la corteza de la glándula adrenal derecha e izquierda están bien delimitados (Figura 11A-H). Los núcleos y citoplasmas de la médula adrenal derecha e izquierda están bien delimitados y fueron similares entre grupos (Figura 11L-R).

Espesor de las capas: El espesor de la Zona Glomerular (ZG) de las glándula adrenales es significativamente menor (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 39.15, p < 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 53.64, p < 0.05$; Figura 11S y T) en los grupos con estrés en comparación con los grupos C y S30. Mientras tanto, la dieta alta en sacarosa no modificó el espesor de la ZG (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.48, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 0.52, p > 0.05$; Figura 11S y T). Resultados similares se observaron para la interacción de la dieta con el estrés crónico (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.15, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 0.008, p > 0.05$; Figura 11S y T).

En la zona fascicular (ZF), el espesor disminuye en los grupos de estrés crónico en comparación con los grupos C y S30 en la glándulas derecha e izquierda ($F_{(1, 1, 31)} = 19.62, p < 0.05$; $F_{(1, 1, 31)} = 20.41, p < 0.05$; respectivamente; Figura 11U y V). Esta variable no se modifica por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.21, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 0.02, p > 0.05$) o por la interacción entre ambos factores (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.02, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 0.11, p > 0.05$; Figura 11U y V). El espesor de zona reticular (ZR) de la glándula derecha incrementa por el estrés crónico ($F_{(1, 1, 31)} = 10.26, p < 0.05$; Figura 11W), pero no por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1, 1, 31)} = 1.33, p > 0.05$) o por la interacción entre ambos factores ($F_{(1, 1, 31)} = 2.38, p > 0.05$; Figura 11W). Sin embargo, la glándula izquierda no fue modificada por ninguno de estos factores (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 4.19, p > 0.05$; ingesta alta de sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 1.97, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.11, p > 0.05$; Figura 11X). El área de la médula en la glándula derecha fue similar entre los grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 1.95, p > 0.05$; ingesta alta de sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 2.85, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.02, p > 0.05$; Figura 11Y). El área de la médula en la glándula izquierda en el grupo S30 es menor que para el resto de los grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 0.003, p > 0.05$; ingesta alta de sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 5.14, p < 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 3.97, p > 0.05$; Figura 11Z).

Densidad celular: En la ZG, la densidad celular no se vio afectada por el estrés crónico, la dieta alta en sacarosa, o la interacción entre ambos factores (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.001, F_{(1, 1, 31)} = 0.24, F_{(1, 1, 31)} = 1.77, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 1.37, F_{(1, 1, 31)} = 1.78, F_{(1, 1, 31)} = 0.43, p > 0.05$; Figuras 12A y B). En la ZF, el estrés crónico incrementa la densidad celular (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 19.33, p < 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 51.47, p < 0.05$), mientras que no se observaron efectos por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 1.69, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 5.91, p > 0.05$) o por la interacción entre ambos factores (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.001, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 1.70, p > 0.05$; Figuras 12C y D). En la ZR, la densidad celular fue similar entre los grupos en la glándula adrenal derecha (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 8.30, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 0.89, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.02, p > 0.05$; Figura 12E), pero aumenta en el grupo S30/St en la glándula adrenal izquierda en comparación con el resto de los grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 2.89, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa ($F_{(1, 1, 31)} = 3.39, p > 0.05$; interacción ($F_{(1, 1, 31)} =$

11.04, $p < 0.002$; Figura 12F). En la médula derecha, el estrés crónico incrementa la densidad celular en comparación con los grupos C y S30 (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 15,12$, $p < 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 1.06$, $p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.10$, $p > 0.05$; Figura 12G), la densidad celular de la médula izquierda fue mayor en el grupo S30/St en comparación con el grupo C (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 0.48$, $p < 0.05$). Sin embargo, la densidad celular no se vio afectado por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1, 1, 31)} = 3.03$, $p > 0.05$), o por la interacción entre ambos factores ($F_{(1, 1, 31)} = 5.47$, $p < 0.02$; Figura 12H).

Tamaño de las células: En la ZG, el porcentaje de células con una superficie de $< 60 \mu\text{m}^2$ y $> 61 \mu\text{m}^2$ de la glándula adrenal derecha fue similar entre los grupos ($p > 0.05$; Figura 13A). Sin embargo, los grupos St y S30/St tenían menos células $< 60 \mu\text{m}^2$ que el grupo S30 ($p < 0.05$; Figura 13B) en la ZG izquierda. Por el contrario, los grupos St y S30/St tenían más células $> 61-100 \mu\text{m}^2$ en la ZG izquierda que el grupo de S30 ($p < 0.05$; Figura 13B). El porcentaje de células $< 60 \mu\text{m}^2$ en los grupos de St y S30/St en la ZF derecha es menor que la del grupo S30 ($p < 0.05$; Figura 13C). Por el contrario, los grupos St y S30/St tienen más células con área $> 101 \mu\text{m}^2$ en la ZF derecha en comparación con el grupo de S30 ($p < 0.05$; Figura 13C). Un resultado similar se observó para la glándula izquierda ($p < 0.05$; Figura 13D). El porcentaje de células $< 60 \mu\text{m}^2$ en la ZR derecha para el grupo St fue más pequeño que para el resto de los grupos ($p < 0.05$; Figura 13E). El porcentaje de células $> 61 \mu\text{m}^2$ fue mayor en el grupo St comparación con el grupo S30 ($p < 0.05$; Figura 13E). El porcentaje de células con un rango de $60-100 \mu\text{m}^2$ en la ZR izquierda fue menor para los grupos St y S30/St en comparación con el resto de los grupos ($p < 0.05$; Figura 13F). Por el contrario, el porcentaje de células con una área de $> 101 \mu\text{m}^2$ fue mayor en los grupos de St y S30/St comparación con el resto de los grupos ($p < 0.001$; Figura 13F). En la médula derecha e izquierda, el porcentaje de células $< 60 \mu\text{m}^2$ fue menor para los grupos con estrés crónico ($p < 0.05$; Figura 13G y H). Por el contrario, el porcentaje de células $> 61 \mu\text{m}^2$ fue alta para los grupos con estrés crónico en la médula derecha e izquierda ($p < 0.05$; Figura 13G y H).

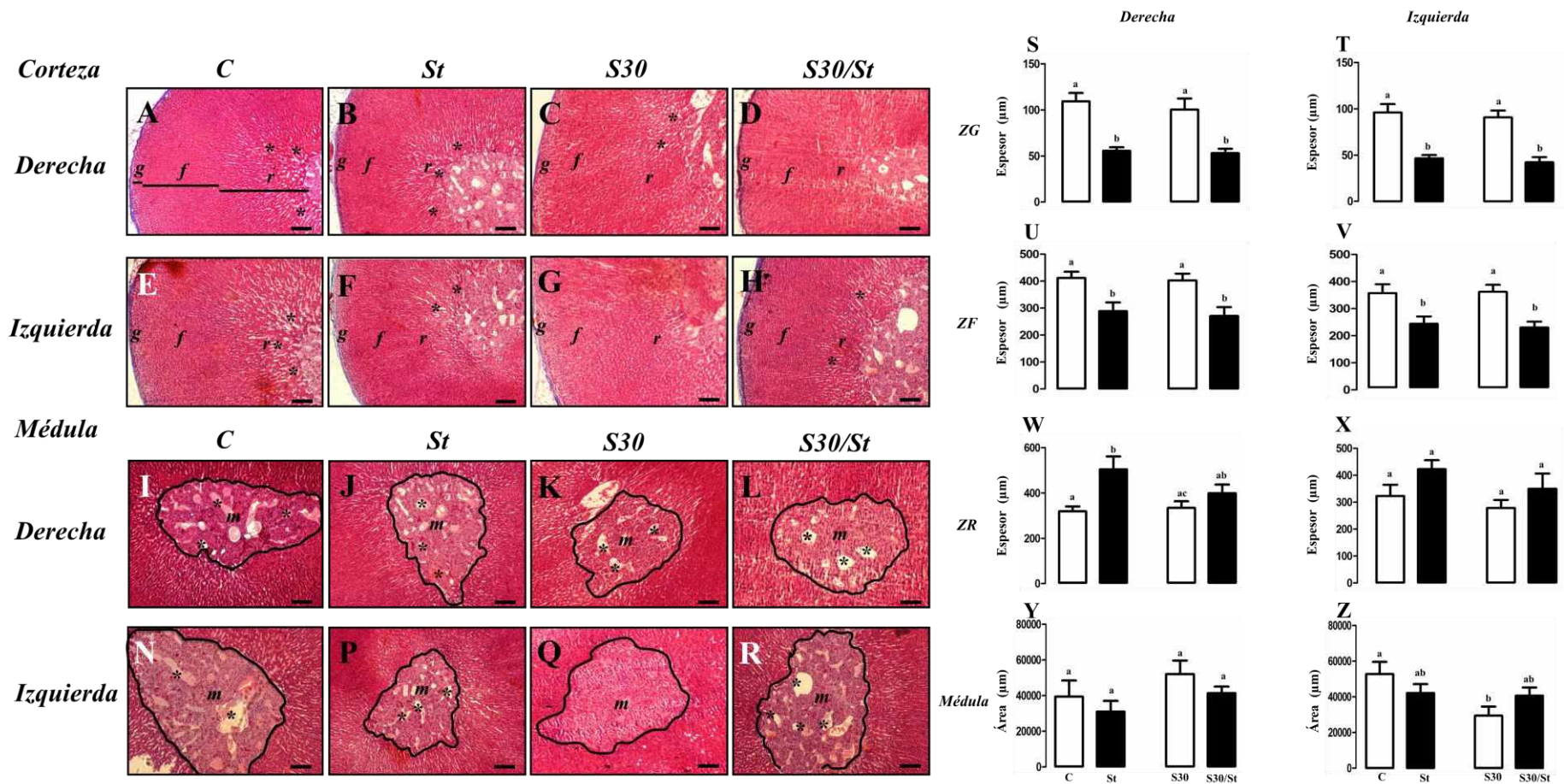


Figura 11. Histología y espesor de la corteza y médula adrenal. Derecha: **A)** Corteza adrenal grupo C; **B)** Corteza adrenal grupo St; **C)** Corteza adrenal grupo S30; **D)** Corteza adrenal grupo S30/St. Izquierda: **E)** Corteza adrenal grupo C; **F)** Corteza adrenal grupo St; **G)** Corteza adrenal grupo S30; **H)** Corteza adrenal grupo S30/St. **Médula** Derecha: **I)** Grupo C; **J)** Grupo St; **K)** Grupo S30; **L)** Grupo S30/St. Izquierda: **N)** Grupo C; **P)** Grupo St; **Q)** Grupo S30; **R)** Grupo S30/St. **Espección:** **S)** ZG derecha; **T)** ZG izquierda; **U)** ZF derecha; **V)** ZF izquierda; **W)** ZR derecha; **X)** ZR izquierda; **Y)** Médula derecha; **Z)** Médula izquierda. Tricrómica de Masson; *g* zona glomerular; *f* zona fascicular; *r* zona reticular; *m* Médula, *asteriscos* Vasos sanguíneos. Barra=50µm; Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo).

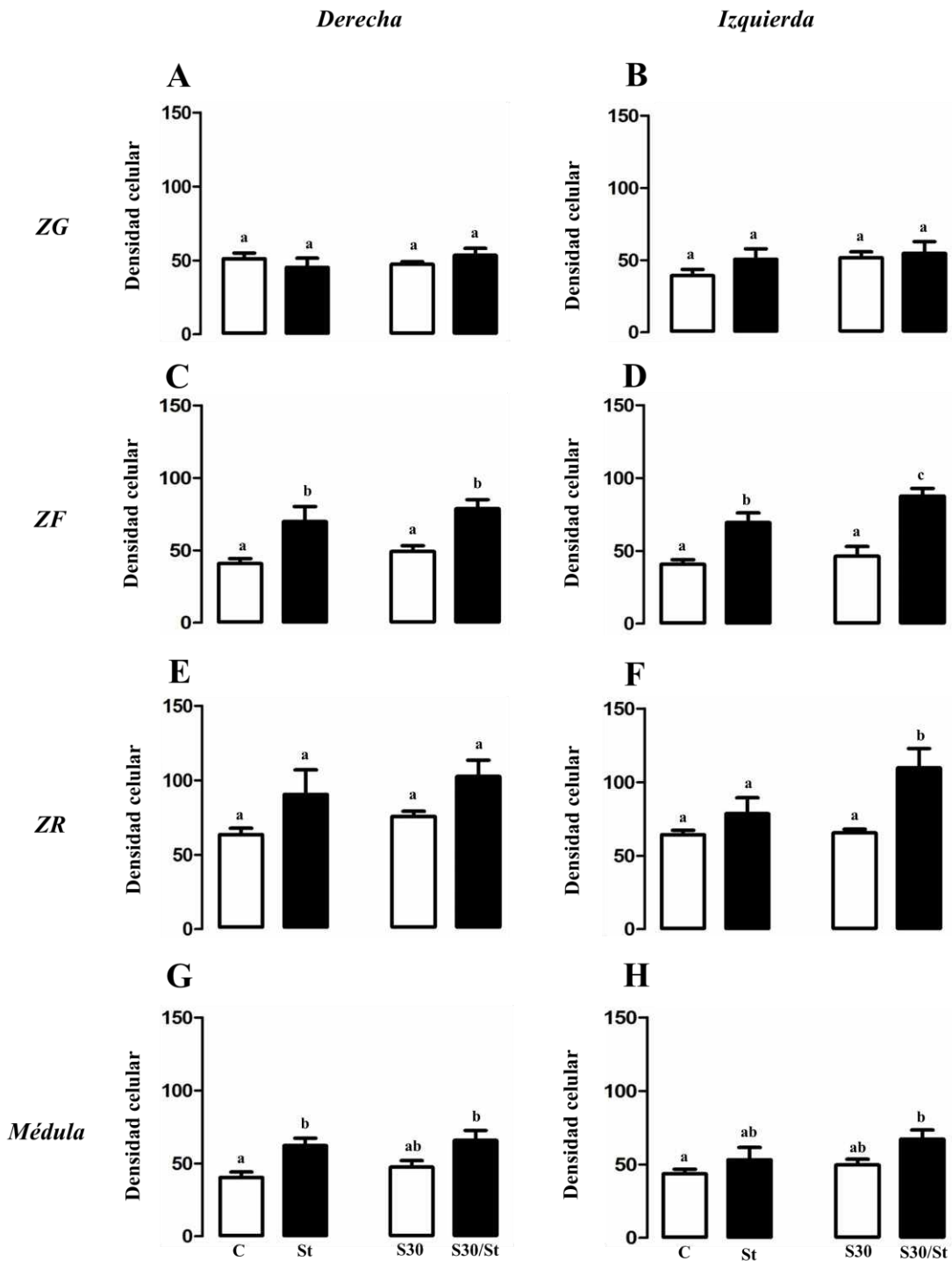


Figura 12. Densidad celular. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo).

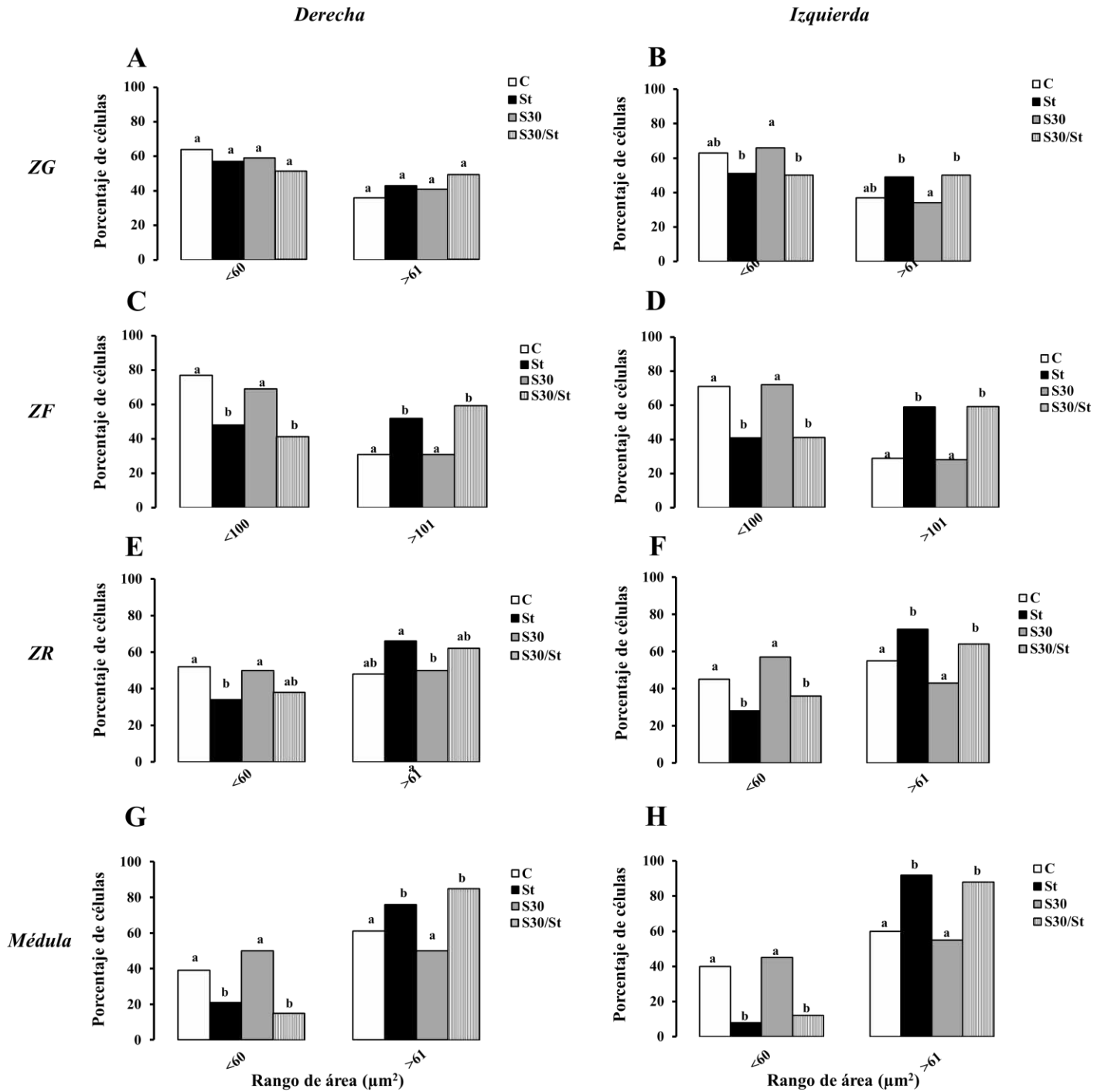


Figura 13. Tamaño de células. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra los porcentajes. Letras diferentes, $p < 0.05$, se realizó una prueba de Chi-cuadrada seguida de una prueba de Fisher. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) ($n=8$ /grupo).

Porcentaje de proliferación: En la ZG, el grupo S30 tiene un porcentaje alto de proliferación (anti-Ki-67 positivo) en la glándula derecha en comparación con el grupo C (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 0.51, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 5.53, p < 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 3.58, p > 0.05$; Figura 14A). Considerando que, el porcentaje de proliferación en los grupos S30 y S30/St fue menor que en los grupos C y St en la ZG izquierda (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 0.74, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,23)} = 25.94, p < 0.05$; interacción, $F_{(1,1,23)} = 0.005, p > 0.05$; Figura 14B). En la ZF, el porcentaje de proliferación fue similar entre los grupos de las glándulas derecha e izquierda (estrés crónico, $F_{(1,1,23)} = 1.67, p > 0.05$; $F_{(1,1,23)} = 0.15, p > 0.05$, respectivamente; ingesta alta de sacarosa, $F_{(1,1,23)} = 3.67, p > 0.05$; $F_{(1,1,23)} = 6.48, p > 0.05$; respectivamente; la interacción, $F_{(1,1,23)} = 0.002, p > 0.05$; $F_{(1,1,23)} = 0.67, p > 0.05$; respectivamente; Figuras 14C y D). En la ZR, no se encontraron diferencias en el porcentaje de proliferación en la glándula derecha (estrés crónico ($F_{(1, 1, 23)} = 3.43, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,23)} = 0.001, p > 0.05$; o interacción, $F_{(1,1,23)} = 1.20, p > 0.05$; Figura 14E) o izquierda (estrés crónico, $F_{(1,1,23)} = 0.29, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,23)} = 3.52, p > 0.05$; interacción, $F_{(1,1,23)} = 2,13, p > 0.05$; Figura 14F). Resultados similares se observaron en la médula derecha (estrés crónico, $F_{(1,1,23)} = 0.002, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,23)} = 0.98, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 0.86, p > 0.05$; Figura 14G) y la médula izquierda (estrés crónico, $F_{(1,1,23)} = 2.20, p > 0.05$; ingesta alta de sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 0.002, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 0.06, p > 0.05$; Figura 14H).

Vasos sanguíneos: El área cubierta por los vasos sanguíneos en la ZR derecha para el grupo St fue significativamente mayor que para el resto de los grupos (el estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 10.70, p < 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 2.46, p > 0.05$; o la interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 0.08, p > 0.05$; Figura 15A). En la glándula izquierda, el área cubierta por los vasos sanguíneos en el grupo S30 era más pequeña que en el resto de los grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 1.06, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 41.84, p < 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 3.67, p > 0.05$; Figura 15B). En la médula, el área cubierta por los vasos sanguíneos en la glándula adrenal derecha se redujo por el estrés crónico en comparación con el grupo C ($F_{(1, 1, 23)} = 21.05, p < 0.05$) y la dieta alta en sacarosa en comparación con el grupo S30/St ($F_{(1, 1, 23)} = 1.73, p < 0.05$), sin interacción ($F_{(1, 1, 23)} = 0.009, p > 0.05$; Figura 15C). Un resultado similar se observó en la médula de la glándula

adrenal izquierda, donde el área cubierta por los vasos sanguíneos se redujo por el estrés crónico en comparación con el grupo C ($F_{(1, 1, 23)} = 58.69, p < 0.05$) y por la dieta alta en sacarosa en comparación con el grupo S30/St ($F_{(1, 1, 23)} = 3.96, p < 0.05$) sin verse afectado por la interacción ($F_{(1, 1, 23)} = 2.36, p > 0.05$; Figura 15D).

Infiltración de células inmunes: El número de células inmunes en los vasos sanguíneos de la ZG derecha fue similar entre los grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 0.14, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 0.41, p > 0.05$; interacción, $F_{(1,1,31)} = 1.11, p > 0.05$; Figura 16A). Sin embargo, el número de células inmunes infiltradas en la ZG izquierda en los grupos con estrés crónico fue mayor que en el resto de los grupos ($F_{(1,1, 23)} = 12.59, p < 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 0.26, p > 0.05$; interacción, $F_{(1,1, 23)} = 3.14, p > 0.05$; Figura 16B). En la ZF, el número de células inmunes en los vasos sanguíneos fue similar entre los grupos en la glándula derecha (estrés crónico, $F_{(1,1,23)} = 0.13, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,23)} = 0.44, p > 0.05$; interacción, $F_{(1,1,23)} = 0.64, p > 0.05$; Figura 16C). Sin embargo, en la ZG izquierda, esta variable fue alta en los grupos con estrés crónico en comparación con los grupos S30 C o (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 15.83, p < 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1, 23)} = 2.37, p > 0.05$; interacción, $F_{(1,1,23)} = 0.03, p > 0.05$; Figura 16D). En la ZR, el número de células inmunes en los vasos sanguíneos fue similar entre los grupos en la glándula derecha (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 2.67, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,23)} = 0.03, p > 0.05$; interacción, $F_{(1,1,23)} = 0.04, p > 0.05$; Figura 16E). Sin embargo, en la ZR izquierda, el número de células inmunes fue mayor en los grupos con estrés crónico en comparación con aquellos sin estrés (estrés crónico, $F_{(1,1,23)} = 67.15, p < 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,23)} = 0.48, p > 0.05$; interacción, $F_{(1,1, 23)} = 1.05, p > 0.05$; Figura 16F). El número de células inmunes en los vasos sanguíneos solamente se redujo en la médula derecha por el estrés crónico ($F_{(1,1,23)} = 14.61, p < 0.05$), pero no por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1,1, 23)} = 0.58, p > 0.05$) o la interacción ($F_{(1,1, 23)} = 0.98, p > 0.05$; Figura 16G). El número de células inmunes en los vasos sanguíneos fue similar en la médula izquierda entre los grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 4.44, p > 0.05$; ingesta alta de sacarosa, $F_{(1,1,23)} = 0.06, p > 0.05$); interacción, $F_{(1,1,23)} = 0.95, p > 0.05$; Figura 16H).

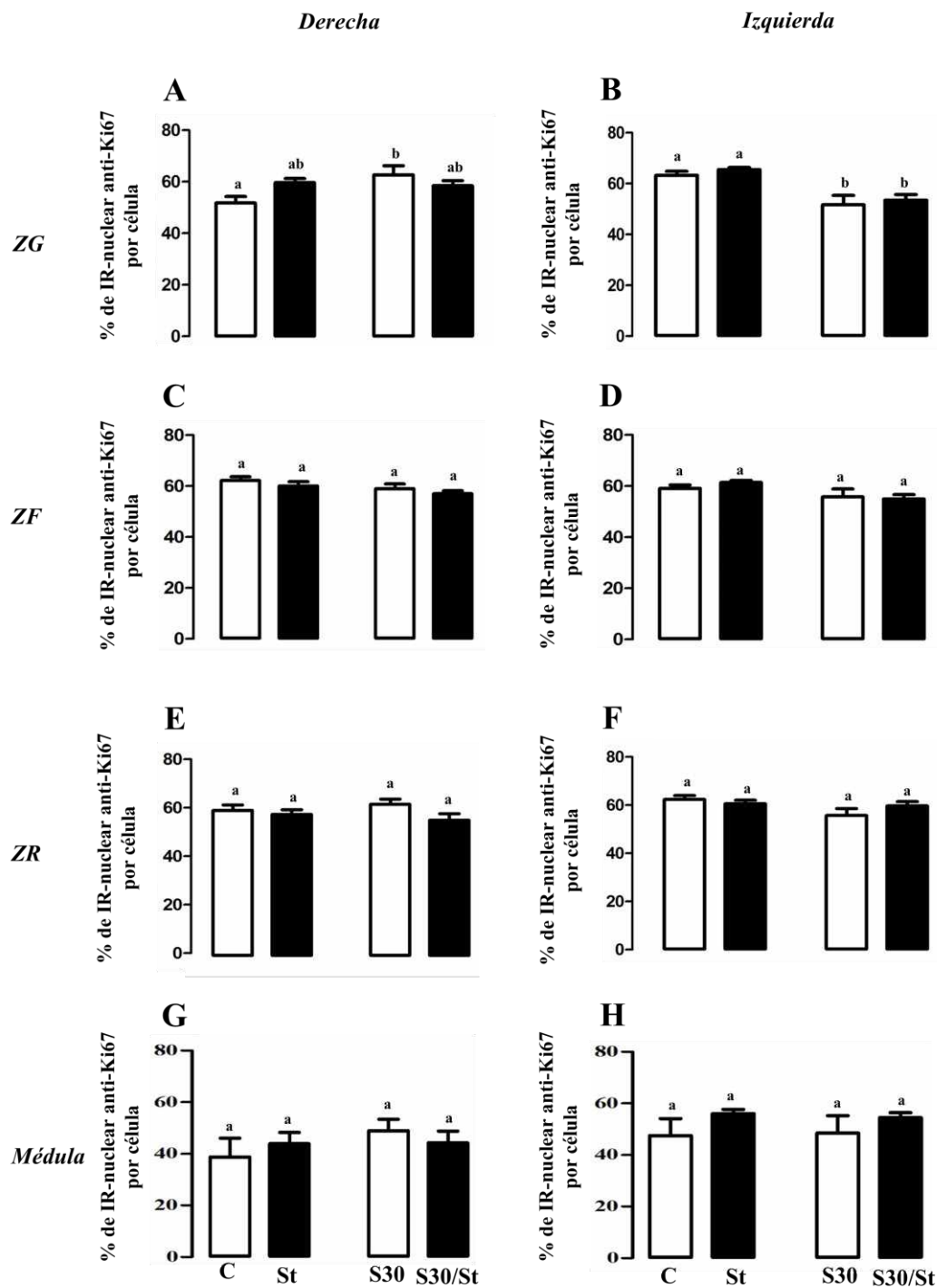


Figura 14. Porcentaje de proliferación. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=6-8/grupo).

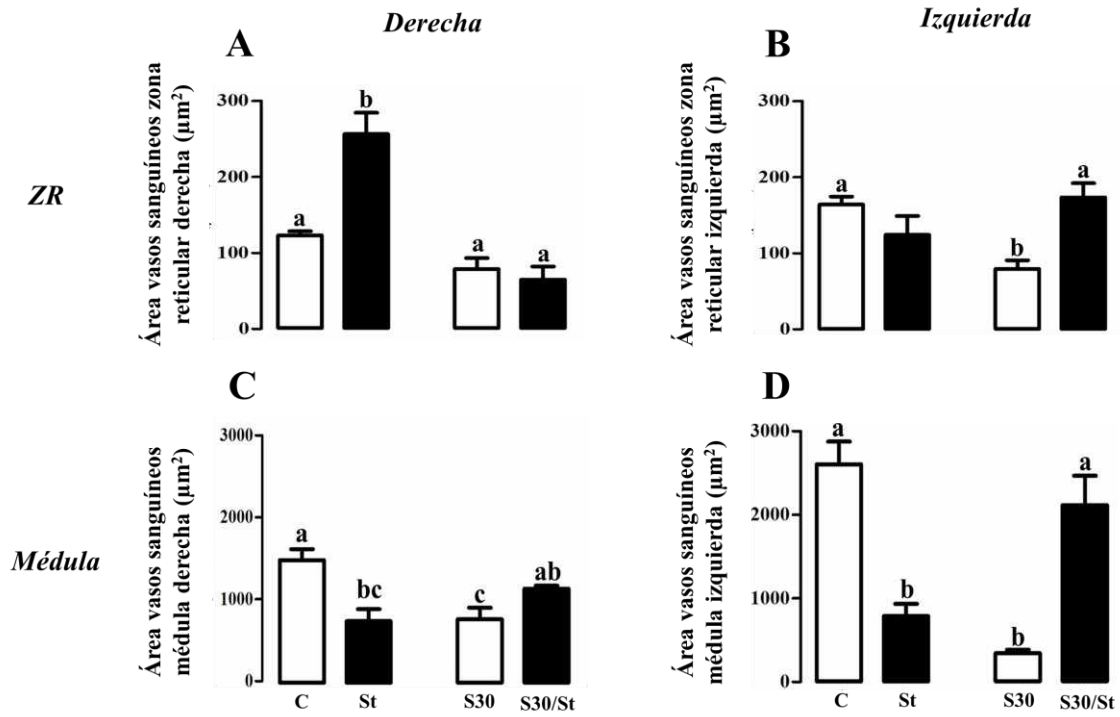


Figura 15. Vasos sanguíneos. A) ZR derecha; B) ZR izquierda; C) Médula derechas; D) Médula izquierda. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=6-8/grupo).

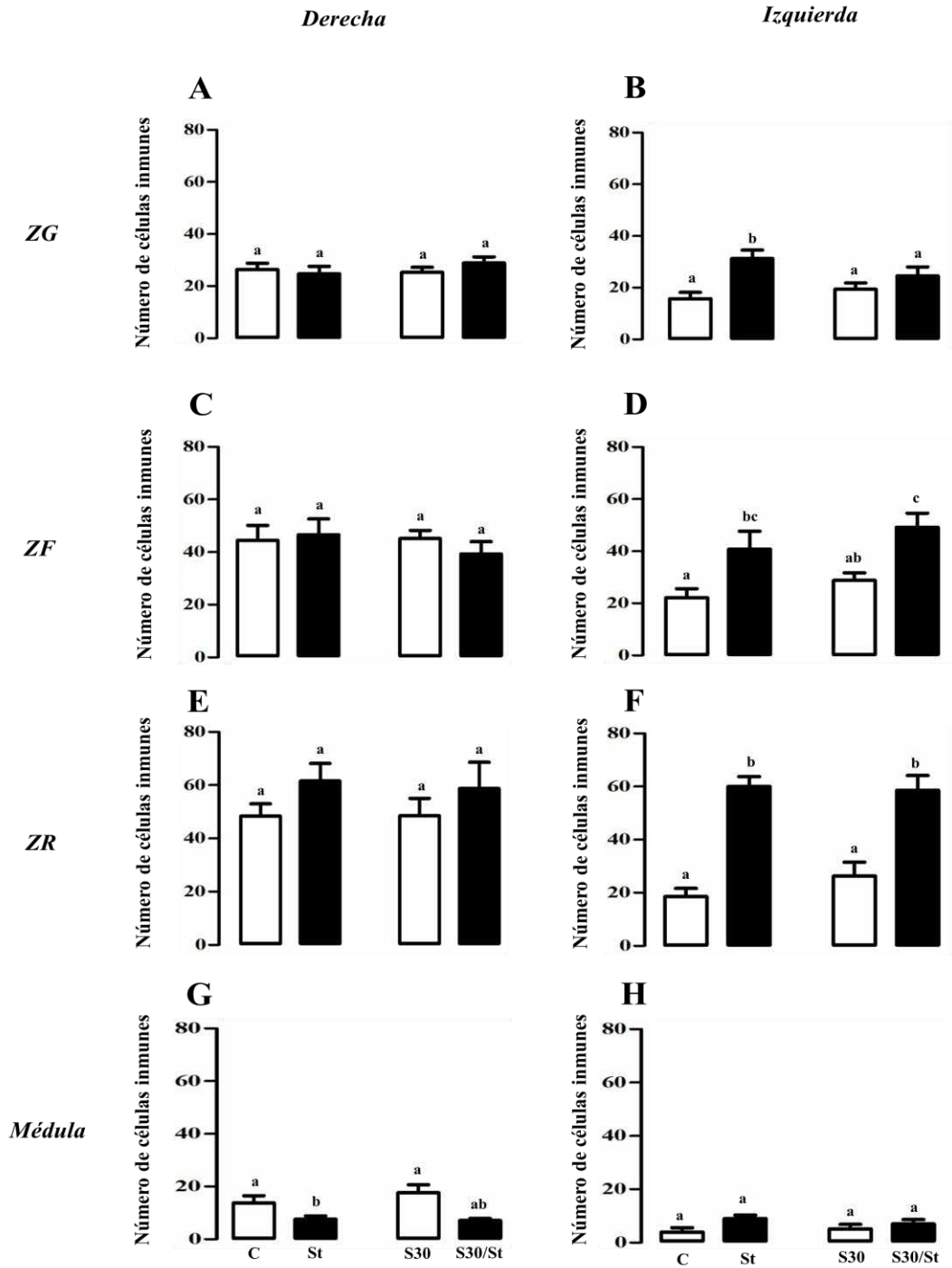


Figura 16. Infiltración de células inmunes. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=6-8/grupo).

7.1.4 Parámetros Hormonales

El estrés crónico incrementa la concentración de corticosterona en el grupo St, comparado con los grupos C, S30 y S30/St ($F_{(1, 1, 23)} = 11.38, p < 0.05$; Figura 17A), sin observar modificaciones por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1, 1, 23)} = 3.09, p > 0.05$; Figura 17A), o la interacción ($F_{(1, 1, 23)} = 3.54, p > 0.05$; Figura 17A), Por otro lado, el estrés crónico no modifica las concentraciones de leptina ($F_{(1, 1, 31)} = 2.28, p > 0.05$; Figura 17B), pero la dieta alta en sacarosa incrementa la concentración de leptina en el grupo S30 comparado con los grupos C, St, y S30/St ($F_{(1, 1, 31)} = 9.83, p < 0.05$; Figura 17B), sin observar modificaciones por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 1, 31)} = 0.60, p > 0.05$; Figura 17B).

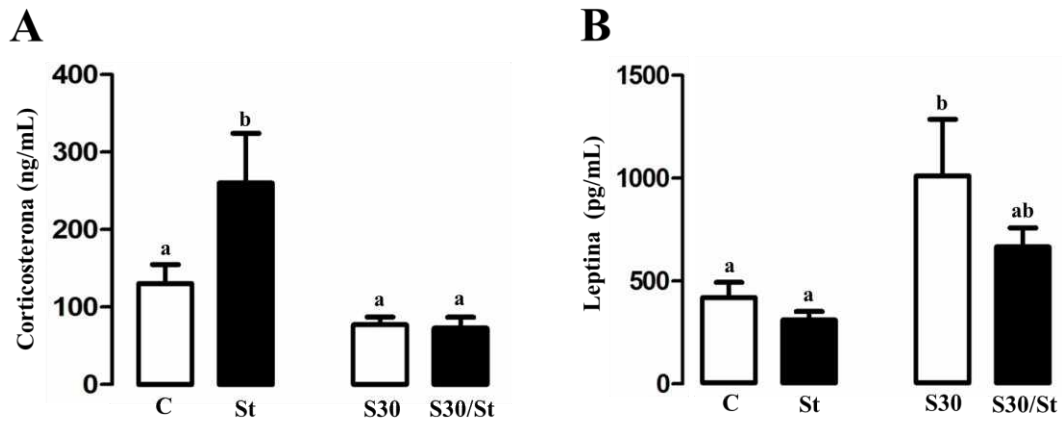


Figura 17. Parámetros hormonales. A) Corticosterona, B) Leptina. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$. Anova dos vías Newman-Keuls post-hoc. Grupo control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St). (n=6-8/grupo).

7.2 Segundo mes

7.2.1 Parámetros de crecimiento

La ganancia de peso corporal disminuye por el estrés crónico ($F_{(1, 1, 31)} = 21.34, p < 0.05$), sin observar modificaciones por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1, 1, 31)} = 0.59, p > 0.05$), o por la interacción de ambos factores ($F_{(1,1,31)} = 0.26, p > 0.05$; Tabla3). La ingesta de alimento disminuye por el estrés crónico ($F_{(1,1,31)} = 25.57, p < 0.05$), por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1, 1, 31)} = 39.71, p < 0.05$), y por la interacción ($F_{(1,1,31)} = 4.05, p < 0.05$; Tabla3). La ingesta total de calorías disminuye por el estrés crónico en el grupo St ($F_{(1,1,31)} = 10.77, p < 0.05$), incrementan por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1,1, 31)} = 64.78, p < 0.05$; Tabla3), sin observar modificaciones por la interacción de ambos factores ($F_{(1,1,31)} = 0.53, p > 0.05$; Tabla3), sin modificar la ingesta de agua (estrés crónico, $F_{(1,1, 31)} = 0.45, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,31)} = 7.81, p > 0.05$, interacción, $F_{(1,1, 31)} = 0.02, p > 0.05$; Tabla3), resultados similares se observan con los niveles de glucosa (estrés crónico, $F_{(1,1,31)} = 0.05, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,31)} = 0.22, p > 0.05$; interacción, $F_{(1,1, 31)} = 0.006, p > 0.05$; Tabla3).

7.2.2 Adiposo Visceral

El índice de adiposidad es similar entre grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 0.43, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 2.63, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.01, p > 0.05$; Figura 18A). Resultados similares se observan con el tejido adiposo visceral (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 1.66, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 3.69, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.03, p > 0.05$; Figura 18B).

Parámetros	C	St	S30	S30/St
Ganancia de peso corporal (g)	212 ±11 ^a	170 ±6 ^b	209 ±9 ^a	157 ±13 ^b
Ingesta de alimento (g/día/100g Peso Corporal)	9 ±0.2 ^a	8 ±0.2 ^b	4 ±0.2 ^c	3 ±0.1 ^d
Ingesta de agua (mL/día/100g Peso Corporal)	19 ±1 ^a	19 ±1 ^a	21 ±1 ^a	21 ±1 ^a
Ingesta calórica (kcal)	31 ±1 ^a	26 ±1 ^b	39 ±1 ^c	37 ±1 ^c
Glucosa (mg/dL)	106 ±8 ^a	110 ±7 ^a	108 ±5 ^a	112 ±12 ^a

Tabla3. Ganancia de peso corporal, ingesta de alimento y agua, ingesta calórica y glucosa. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p<0.0001$; $p<0.001$; ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo).

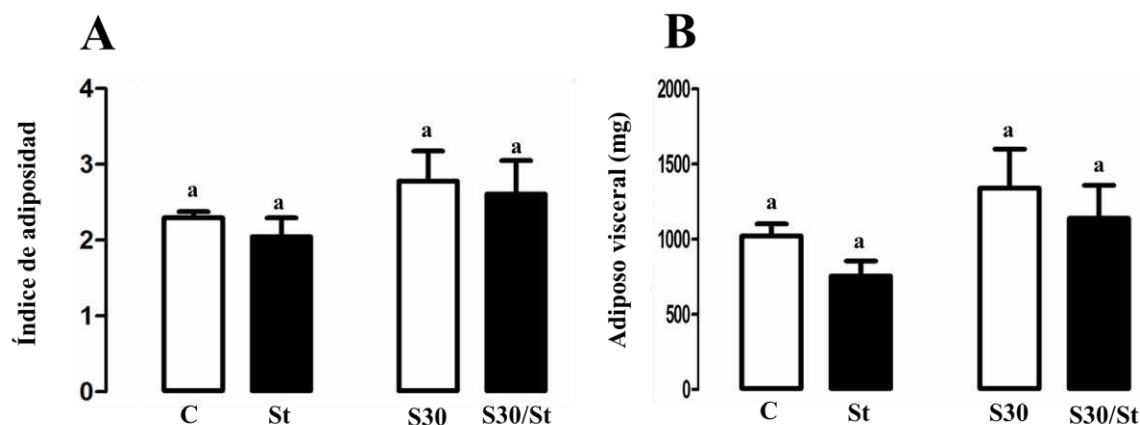


Figura 18. Índice de adiposidad (A) y tejido adiposo visceral (B). Se muestra la media±e.e. Sin diferencias significativas. $p>0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo)

7.2.3 Peso y características histológicas de la glándula adrenal

Peso de la glándula adrenal: El peso de la glándula adrenal derecha es similar entre grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 0.98$, $p>0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 0.001$, $p>0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.42$, $p>0.05$; Figura 19A), resultados similares se observan con en el peso de la glándula adrenal izquierda (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 4.22$, $p>0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 0.12$, $p>0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.03$, $p>0.05$; Figura 19B).

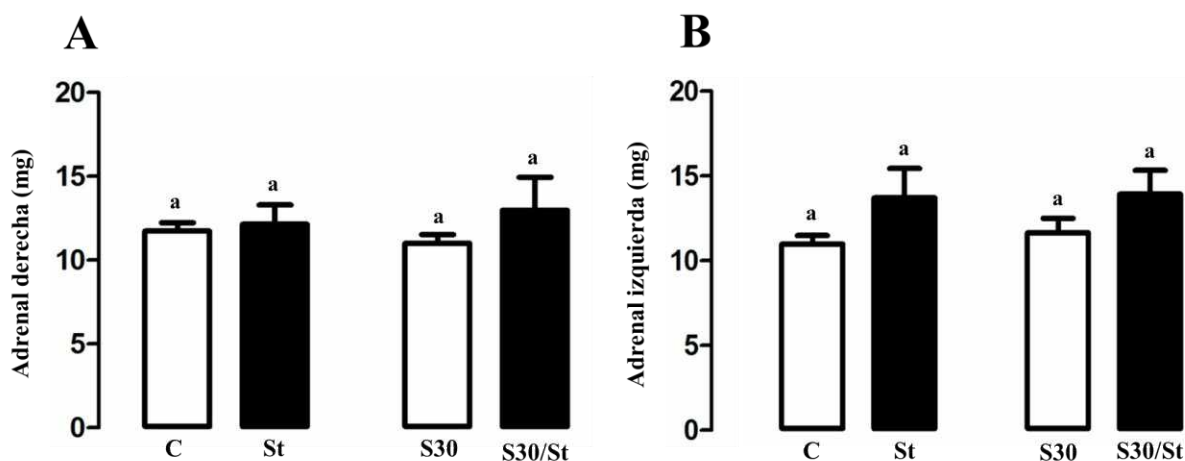


Figura 19. Peso de las glándulas adrenales derecha (A) e izquierda (B) al primer mes. Se muestra la media \pm e.e. Sin diferencias significativas $p > 0.05$, Anova dos vías Newman-Keuls post-hoc. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo)

7.2.3.2 Características histológicas de la glándula adrenal

Los núcleos y citoplasma de las células de la corteza de la glándula adrenal derecha e izquierda están bien delimitados (Figura 20A-H). Los núcleos y citoplasmas de la médula adrenal derecha e izquierda están bien delimitados y fueron similares entre grupos (Figura 20I-R).

Espesor de las capas: El espesor de la Zona Glomerular (ZG) disminuye por el estrés crónico en comparación con los grupos C y S30 (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 29.52$, $p < 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 33.11$, $p < 0.05$; Figura 20S y T). Sin observar diferencias por la dieta alta en sacarosa en la glándula derecha ($F_{(1, 1, 31)} = 0.05$, $p > 0.05$; Figura 20S), pero en la glándula izquierda, la dieta alta en sacarosa disminuye el espesor en el grupo S30 con respecto al grupo C ($F_{(1, 1, 31)} = 6.56$, $p < 0.05$; Figura 20T). No observamos diferencias por la interacción de ambos factores (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.22$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 1.03$, $p > 0.05$; Figura 20S y T). En la zona fascicular (ZF), no observamos diferencias por el estrés crónico (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 2.96$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 10.89$; $p < 0.05$; Figura 20U y V), por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.23$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 0.80$, $p > 0.05$; Figura 20U y V), o por la interacción de ambos factores (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.59$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 0.12$, $p > 0.05$; Figura 20U y V). Resultados similares se observaron con el espesor de zona reticular (ZR) de la glándula

derecha e izquierda (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 0.15$, $p > 0.05$; $F_{(1, 1, 31)} = 3.68$, $p > 0.05$; respectivamente; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 1.92$, $p > 0.05$; $F_{(1, 1, 31)} = 0.27$, $p > 0.05$; respectivamente; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.57$, $p > 0.05$; $F_{(1, 1, 31)} = 1.12$, $p > 0.05$; respectivamente, Figura 20W y X). El área de la médula, no mostró diferencias por el estrés crónico (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.81$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 1.54$, $p > 0.05$; Figura 20Y y Z), la dieta lata en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 4.91$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 1.48$, $p > 0.05$; Figura 20Y y Z) e interacción (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 1.002$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 0.44$, $p > 0.05$; Figura 20Y y Z).

Densidad celular: En la ZG, la densidad celular no se vió afectada por el estrés crónico, la dieta alta en sacarosa, o la interacción entre ambos factores (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 2.73$, $F_{(1, 1, 31)} = 0.83$, $F_{(1, 1, 31)} = 0.83$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 0.45$, $F_{(1, 1, 31)} = 0.20$, $F_{(1, 1, 31)} = 0.90$, $p > 0.05$; Figuras 21A y B). En la ZF, el estrés crónico incrementa la densidad celular en los grupos St y S30+St comparados con los grupos C y S30 respectivamente (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 55.94$, $p < 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 15.27$, $p < 0.05$; Figuras 21C y D), sin observar diferencias por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 2.16$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 0.22$, $p > 0.05$; Figuras 21C y D), o por la interacción entre ambos factores (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 0.20$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 0.25$, $p > 0.05$; Figuras 21C y D). En la ZR, la densidad celular incrementa por el estrés crónico en la glándula derecha (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 4.81$, $p < 0.05$; Figura 21E), pero no se modifica en la glándula adrenal izquierda (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 0.07$, $p > 0.05$; Figura 21F), sin observar modificaciones por la dieta o por la interacción de ambos factores (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 7.01$, $F_{(1, 1, 31)} = 1.09$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 3.81$, $F_{(1, 1, 31)} = 0.15$, $p > 0.05$; Figuras 21E y F). En la médula, la densidad celular no se vio afectada por el estrés crónico, la dieta alta en sacarosa, o la interacción entre ambos factores (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 1.44$, $F_{(1, 1, 31)} = 0.04$, $F_{(1, 1, 31)} = 0.56$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 31)} = 1.02$, $F_{(1, 1, 31)} = 1.58$, $F_{(1, 1, 31)} = 0.26$, $p > 0.05$; Figuras 21G y H).

Tamaño de las células: En la ZG, el porcentaje de células con una superficie de $< 60 \mu\text{m}^2$ incrementa en el grupo St, comparado con los grupos C y S30/St ($p > 0.05$; Figura 22A). Sin embargo, el grupo S30 tiene menos células $< 60 \mu\text{m}^2$ que el grupo S30/St ($p > 0.05$; Figura 22A).

Por el contrario, el porcentaje de células $>61 \mu\text{m}^2$ disminuye en el grupo St respecto a los grupos C y S30/St ($p>0.05$; Figura 22A y B), y son más grandes en el grupo S30 que en el grupo S30/St ($p>0.05$; Figura 22A). En la glándula izquierda, el número de células $<60 \mu\text{m}^2$ incrementa en el grupo St respecto a los grupos C y S30/St y disminuye en los grupos S30 y S30/St comparados al grupo C ($p>0.05$; Figura 22B). Por el contrario, el porcentaje de células $>61 \mu\text{m}^2$ disminuye en el grupo St respecto a los grupos C y S30/St y son más grandes en los grupos S30 y S30/St, que en el grupo C ($p>0.05$; Figura 22B). El porcentaje de células $<100 \mu\text{m}^2$ y $>101 \mu\text{m}^2$ en la ZF derecha es similar entre grupos ($p>0.05$; Figura 22C). Sin embargo, en la ZF izquierda el porcentaje de células $<100 \mu\text{m}^2$ disminuye en el grupo S30 respecto al grupo C ($p<0.05$; Figura 22D). Por el contrario el porcentaje de células $>101 \mu\text{m}^2$ es mayor en el grupo S30 que en los grupos C y S30/St ($p<0.05$; Figura 22D). El porcentaje de células $<60 \mu\text{m}^2$ en la ZR derecha, disminuye en el grupo S30 respecto al grupo C, pero disminuye aún más en el grupo S30/St que en los grupos C y S30 ($p<0.05$; Figura 22E). Por el contrario, el porcentaje de células $>61 \mu\text{m}^2$ incrementa en el grupo S30 comparado con el grupo C. y son mas grandes en el grupo S30/St, que en los grupos C y S30/St ($p<0.05$; Figura 22E). En la ZR izquierda, el porcentaje de células $<60 \mu\text{m}^2$ disminuye en el grupo S30, respecto al grupo C; pero son más pequeñas aún en el grupo S30/St que en los grupos C y St ($p<0.05$; Figura 22F). Por el contrario, el porcentaje de células $>61 \mu\text{m}^2$ incrementa en el grupo S30, respecto al grupo Ct; pero son más grandes aún en el grupo S30/St que en los grupos C y St ($p<0.05$; Figura 22F). En la médula derecha, el porcentaje de células $<80 \mu\text{m}^2$ fue menor para el grupo S30/St, respecto a los grupos C, St, y S30 ($p<0.05$; Figura 22G). Por el contrario, el porcentaje de células $>81 \mu\text{m}^2$ incremento en el grupo S30/St comparado con los grupos C, St y S30 ($p<0.05$; Figura 22G). Sin embargo, en la médula izquierda, el porcentaje de células $<80 \mu\text{m}^2$ disminuye en el grupo St respecto al grupo C ($p<0.05$; Figura 22H), pero disminuye aun más en el grupo S30/St, comparado con los grupos C, St y S30 ($p<0.05$; Figura 22H). Por el contrario, el porcentaje de células $>81 \mu\text{m}^2$ incremento solamente en el grupo St respecto a los grupos C y S30/St ($p<0.05$; Figura 22H).

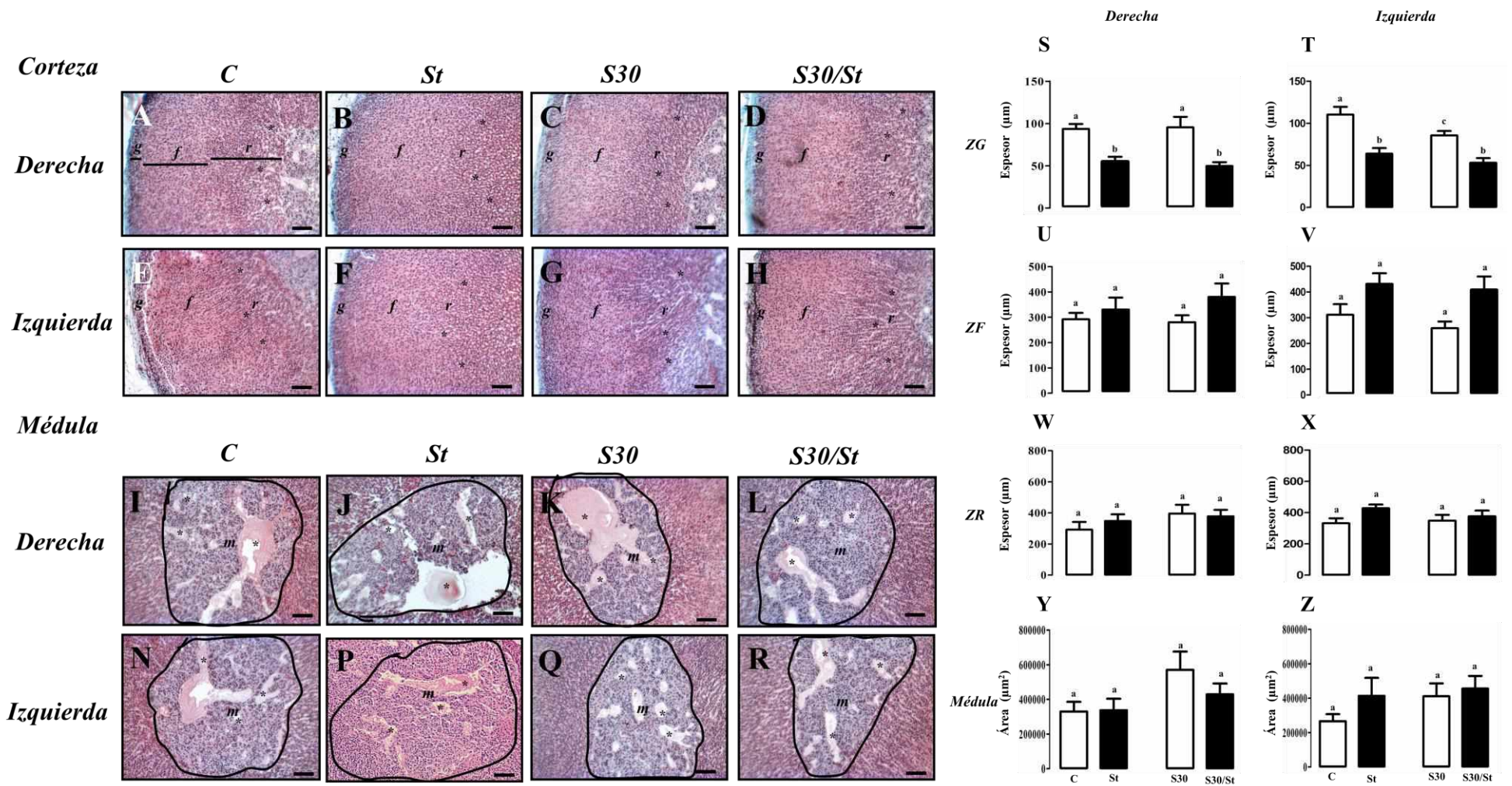


Figura 20. Histología y espesor de la corteza y médula adrenal. Derecha: **A)** Corteza adrenal grupo C; **B)** Corteza adrenal grupo St; **C)** Corteza adrenal grupo S30; **D)** Corteza adrenal grupo S30/St. Izquierda: **E)** Corteza adrenal grupo C; **F)** Corteza adrenal grupo St; **G)** Corteza adrenal grupo S30; **H)** Corteza adrenal grupo S30/St. **Médula** Derecha: **I)** Grupo C; **J)** Grupo St; **K)** Grupo S30; **L)** Grupo S30/St. Izquierda: **N)** Grupo C; **P)** Grupo St; **Q)** Grupo S30; **R)** Grupo S30/St. **Espesor:** **S)** ZG derecha; **T)** ZG izquierda; **U)** ZF derecha; **V)** ZF izquierda; **W)** ZR derecha; **X)** ZR izquierda; **Y)** Médula derecha; **Z)** Médula izquierda. Tricrómica de Masson; *g* zona glomerular; *f* zona fascicular; *r* zona reticular; *m* Médula, *asteriscos* Vasos sanguíneos. Barra=50μm; Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo).

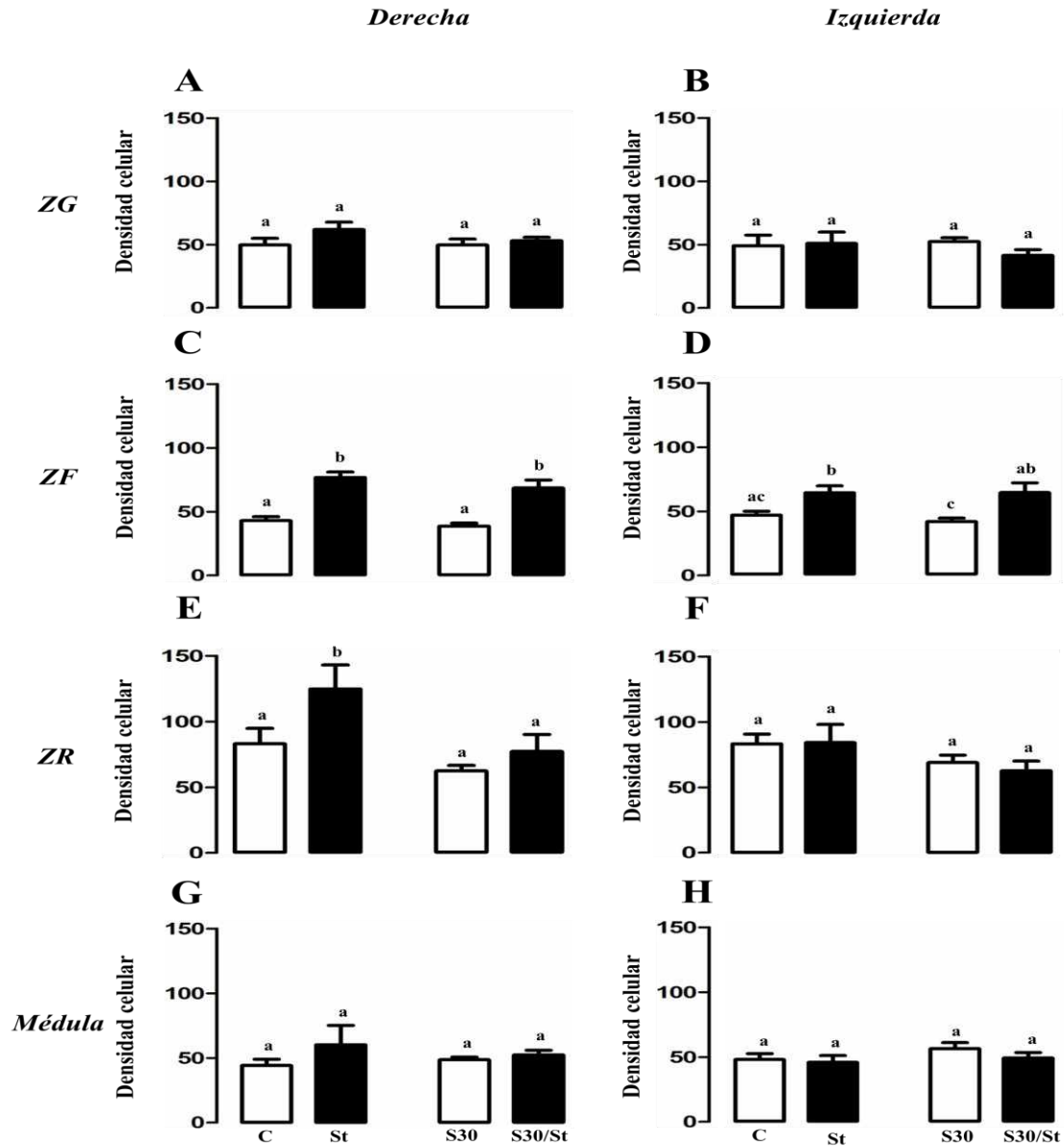


Figura 21. Densidad celular. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls pos hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) ($n=6-8$ /grupo).

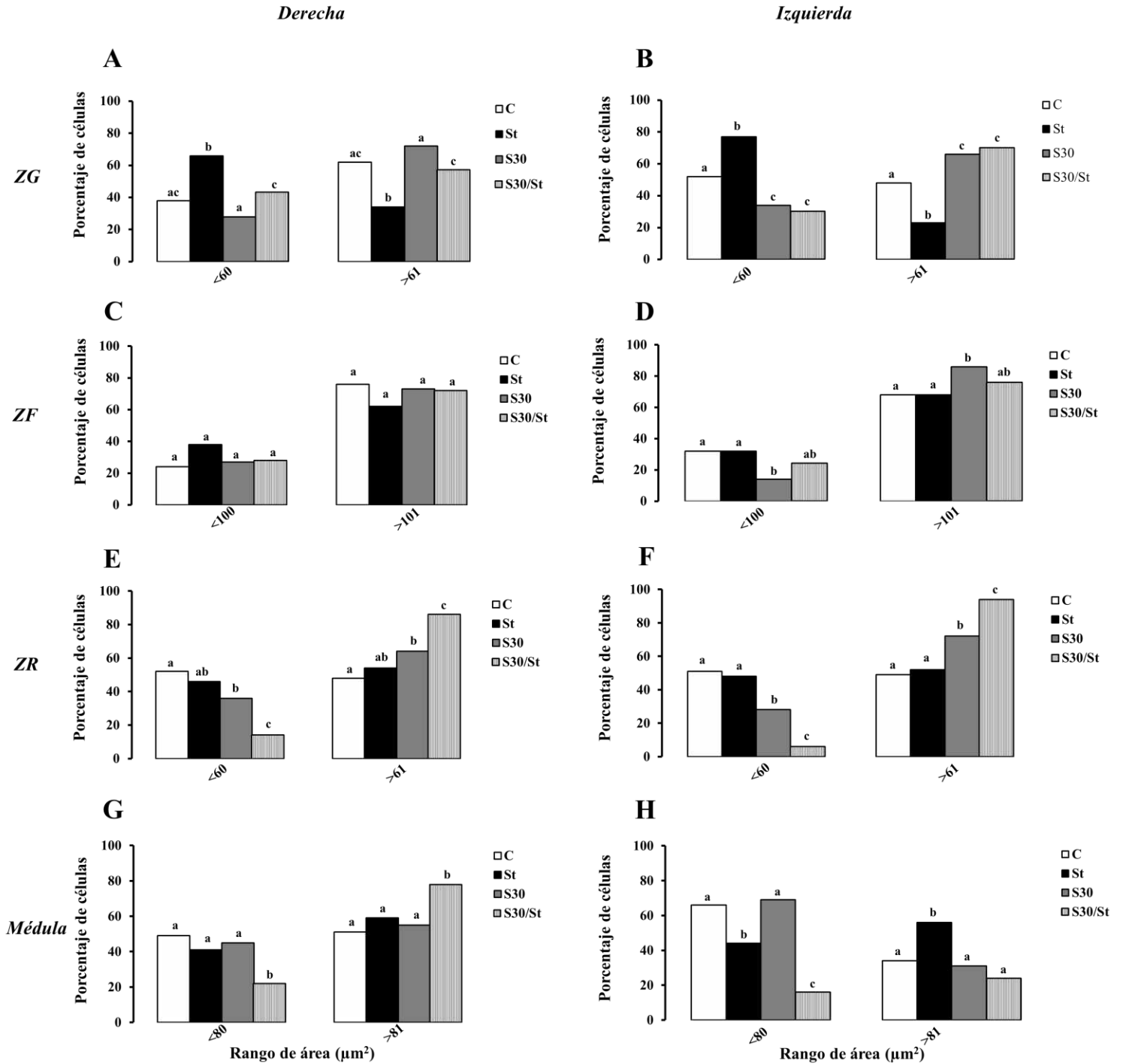


Figura 22. Tamaño de las células. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra el porcentaje de células. Letras diferentes, $p < 0.05$, se realizó una prueba de Chi-cuadrada seguida de una prueba de Fisher. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) ($n=6-8$ /grupo).

Porcentaje de proliferación: En la ZG, el porcentaje de proliferación fue similar entre grupos y glándulas derecha e izquierda (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 0.01, p > 0.05$; $F_{(1, 1, 23)} = 0.009, p > 0.05$, respectivamente; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 1.86, p > 0.05$; $F_{(1, 1, 23)} = 0.001, p > 0.05$; respectivamente; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 1.74, p > 0.05$; $F_{(1, 1, 23)} = 2.61, p > 0.05$; respectivamente; Figuras 23A y B). En la ZF, no se observaron diferencias por el estrés crónico (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 0.40, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 0.84, p > 0.05$; Figura 23C y D), la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 0.77, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 1.70, p > 0.05$; Figura 237C y D) o por la interacción (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 0.02, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 0.75, p > 0.05$; Figura 23C y D). En la ZR, el porcentaje de proliferación fue similar entre los grupos y glándulas derecha e izquierda (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 0.04, p > 0.05$; $F_{(1, 1, 23)} = 1.31, p > 0.05$, respectivamente; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 0.06, p > 0.05$; $F_{(1, 1, 23)} = 0.70, p > 0.05$; respectivamente; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 0.27, p > 0.05$; $F_{(1, 1, 23)} = 1.41, p > 0.05$; respectivamente; Figuras 23E y F). En la médula, no se observaron diferencias en el porcentaje de proliferación en la glándula derecha (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 0.31, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 3.26, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 1.72, p > 0.05$; Figura 23G) o en la glándula izquierda (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 0.21, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 2.02, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 1.35, p > 0.05$; Figura 23H).

Vasos sanguíneos: El área cubierta por los vasos sanguíneos en la ZR, no presento diferencias en la glándula derecha (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 0.26, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 1.55, p > 0.05$; o la interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 10.05, p > 0.05$; Figura 24A), o en la glándula izquierda (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 0.05, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 2.28, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 0.13, p > 0.05$; Figura 24B). En la médula, el área cubierta por los vasos sanguíneos en la glándula adrenal derecha fue similar entre grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 0.09, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 4.39, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 0.88, p > 0.05$; Figura 24C). Sin embargo, en la médula izquierda, el área cubierto por los vasos sanguíneos disminuye por el estrés crónico en comparación con el grupo C ($F_{(1, 1, 23)} = 6.17, p < 0.05$; Figura 24D) y por la dieta alta en sacarosa en comparación con el grupo S30/St ($F_{(1, 1, 23)} = 32.97, p < 0.05$; Figura 24D), pero no por la interacción ($F_{(1, 1, 23)} = 0.96, p > 0.05$; Figura 24D).

Infiltración de células inmunes: El número de células inmunes dentro de los vasos sanguíneos incrementan por el estrés crónico en la ZG (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 30.03$, $p < 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 24.46$, $p < 0.05$; Figura 25A y B). Aunque, la dieta alta en sacarosa no muestra diferencias significativas en el número de células inmunes (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 0.73$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 0.74$, $p > 0.05$; Figura 25A y B), el grupo S30 tiene más número de células inmunes, respecto al grupo C en la glándula derecha ($p < 0.05$; Figura 25A). Por otro lado, la interacción incrementa el número de células en el grupo S30/St respecto al grupo C en la glándula derecha ($F_{(1, 1, 23)} = 10.23$, $p < 0.05$; Figura 25A), sin observar diferencias en la glándula izquierda ($F_{(1, 1, 23)} = 3.85$, $p > 0.05$; Figura 25B). En la ZF, el número de células inmunes dentro de los vasos sanguíneos incrementa por el estrés crónico en el grupo St, respecto al grupo C en la glándula derecha ($F_{(1, 1, 23)} = 10.87$, $p < 0.05$; Figura 25C). Esta variable es mayor en los grupos de estrés crónico comparados con los grupos C y S30 en la glándula izquierda ($F_{(1, 1, 23)} = 10.84$, $p < 0.05$; Figura 25D), sin observar diferencias por la dieta (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 0.08$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 0.59$, $p > 0.05$; Figura 25C y E), o por la interacción de ambos factores (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 2.08$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 1.70$, $p > 0.05$; Figura 25C y E). En la ZR, el estrés crónico incrementa el número de células inmunes en el grupo St, respecto a los grupos C y S30/St en la glándula derecha ($F_{(1, 1, 23)} = 30.87$, $p < 0.05$; Figura 25E), esta variable es mayor en los grupos de estrés crónico comparados con los grupos C y S30 en la glándula izquierda ($F_{(1, 1, 23)} = 14.34$, $p < 0.05$; Figura 25F). Por el contrario, el número de células inmunes en la glándula derecha disminuye por la dieta alta en sacarosa en los grupos S30 y S30/St comparados con el grupo C y St respectivamente ($F_{(1, 1, 23)} = 17.68$, $p < 0.05$; Figura 25E), sin observar modificaciones en la glándula izquierda ($F_{(1, 1, 23)} = 0.02$, $p > 0.05$; Figura 25F), tampoco observamos diferencias por la interacción (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 0.18$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 0.27$, $p > 0.05$; Figura 25E y F). El número de células inmunes dentro de los vasos sanguíneos es similar en la médula derecha e izquierda (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)} = 1.36$, $p > 0.05$; $F_{(1, 1, 23)} = 0.94$, $p > 0.05$, respectivamente; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)} = 0.006$, $p > 0.05$; $F_{(1, 1, 23)} = 1.16$, $p > 0.05$, respectivamente; interacción, $F_{(1, 1, 23)} = 0.95$, $p > 0.05$; $F_{(1, 1, 23)} = 2.97$, $p > 0.05$, respectivamente; Figuras 25G y H).

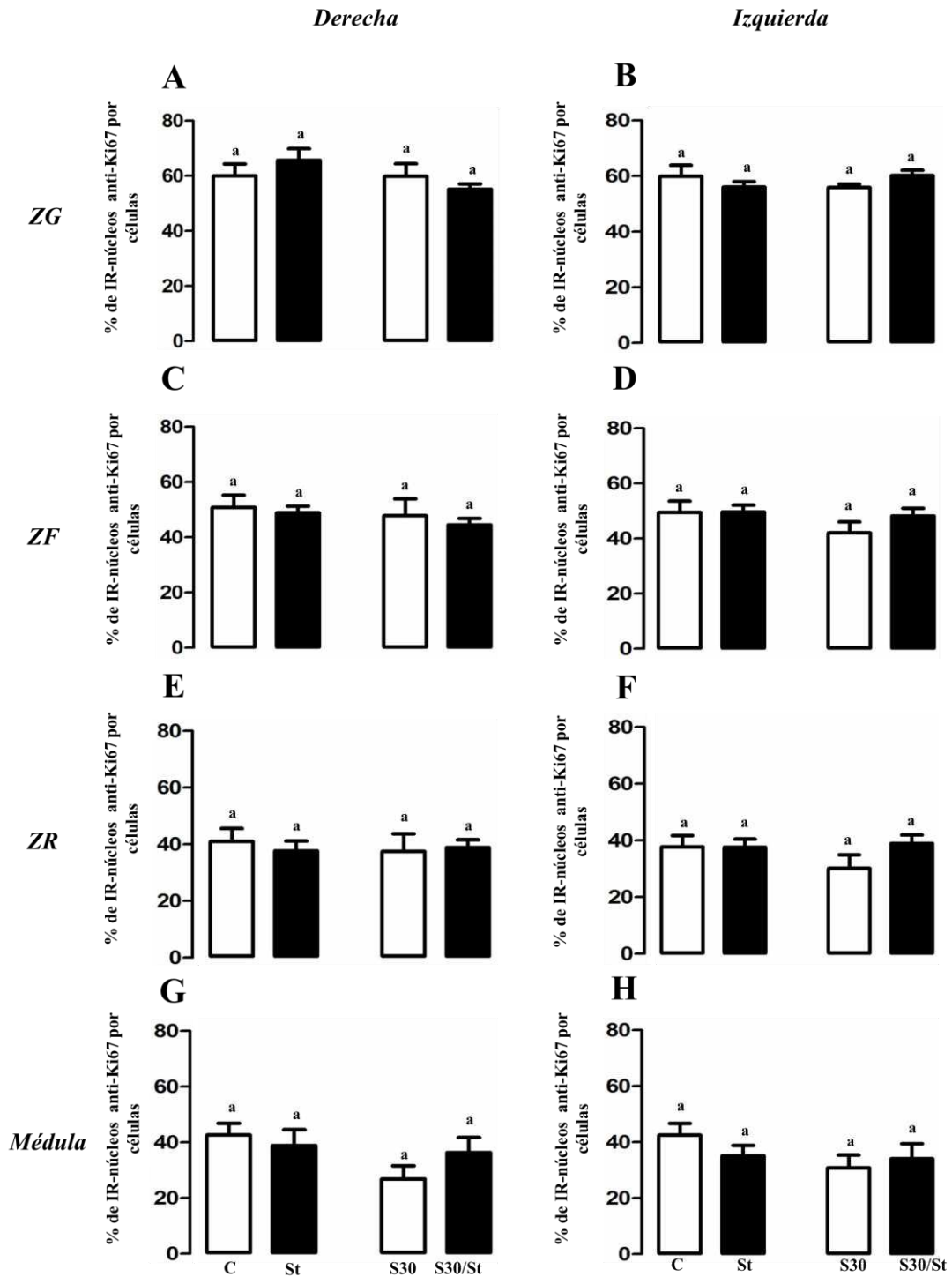


Figura 23. Porcentaje de proliferación. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls pos hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) ($n=6-8/\text{grupo}$).

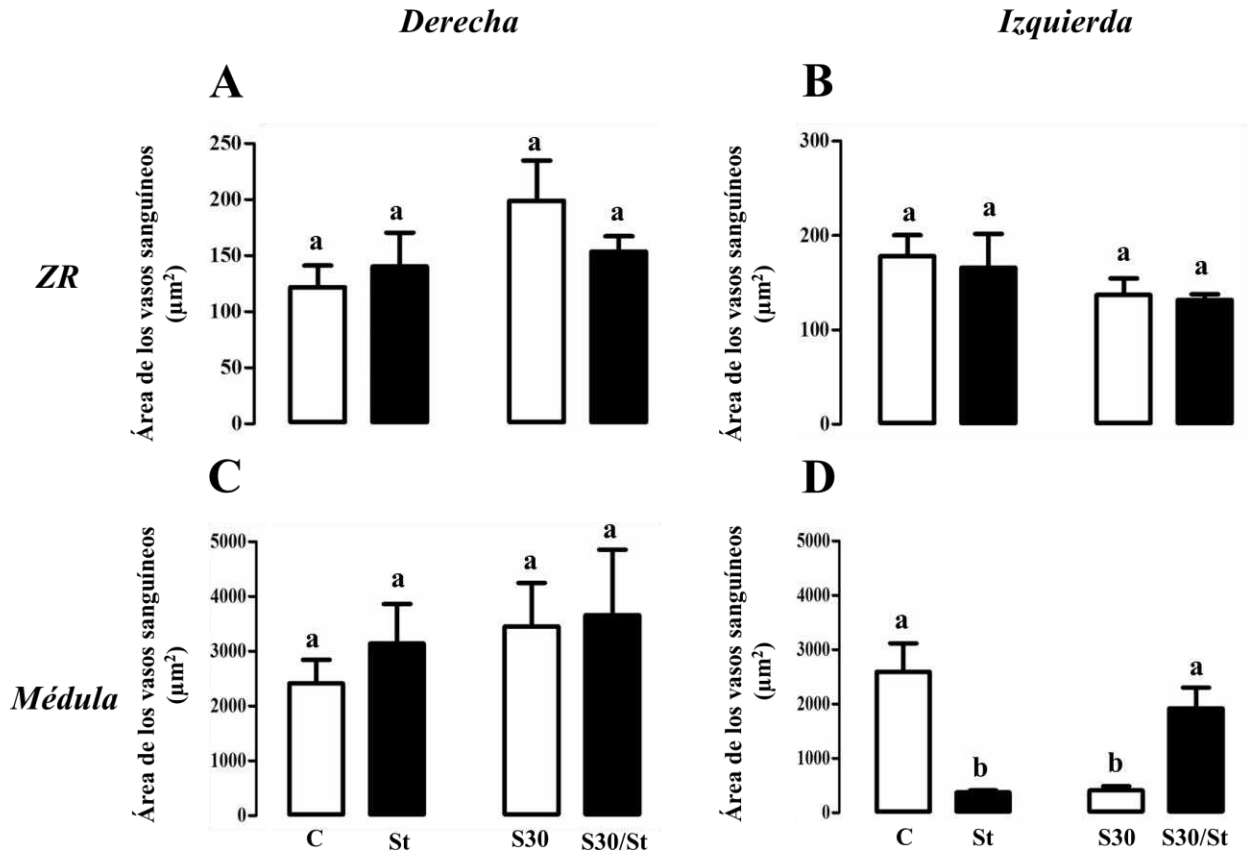


Figura 24. Vasos sanguíneos. A) ZR derecha; B) ZR izquierda; C) Médula derecha; D) Médula izquierda. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=6-8/grupo).

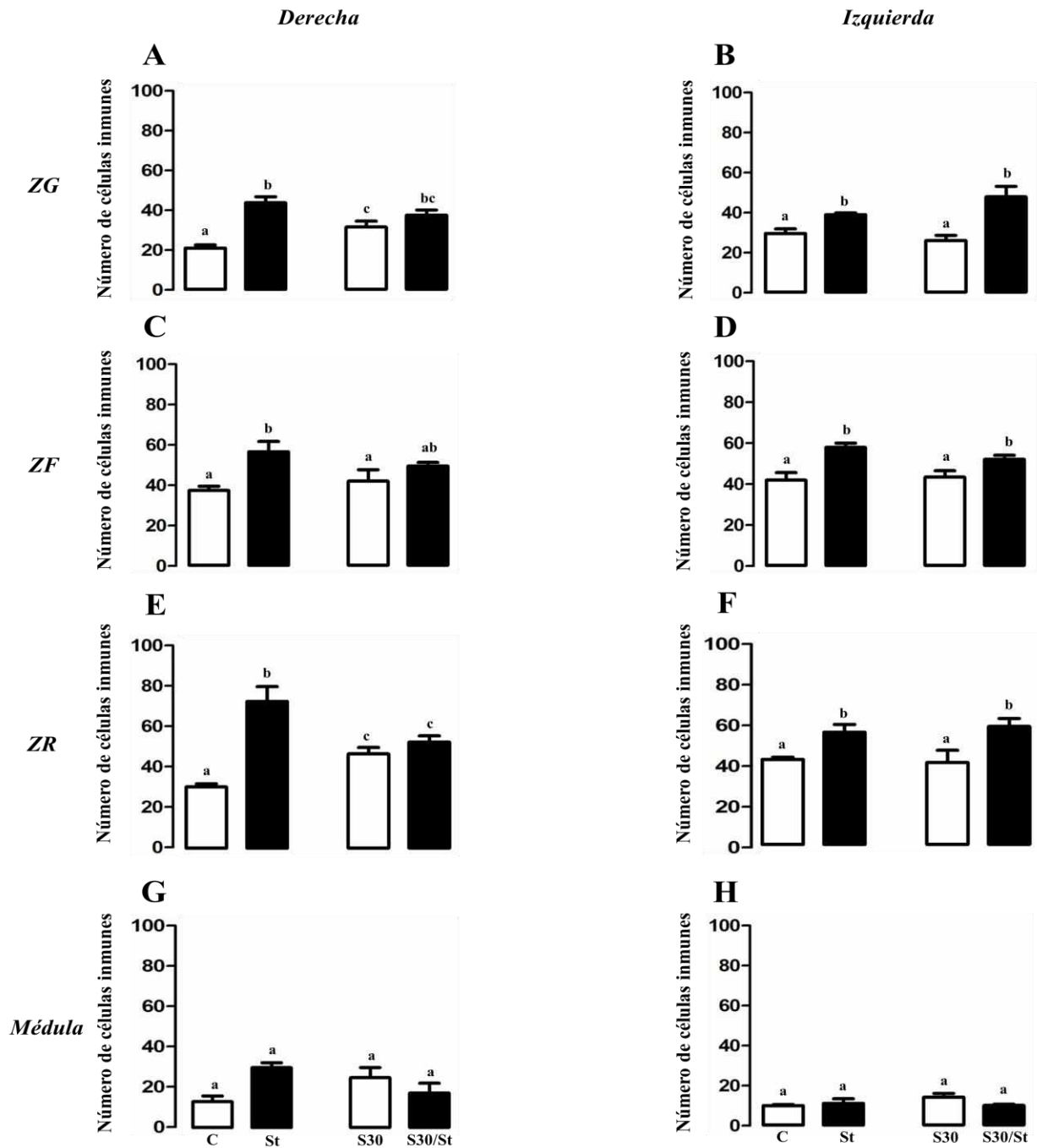


Figura 24. Infiltración de células inmunes. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=6-8/grupo).

7.2.4 Parámetros Hormonales

El estrés crónico no afectó la concentración de corticosterona ($F_{(1, 1, 31)} = 0.00002$, $p > 0.05$; Figura 25A), sin embargo, la dieta alta en sacarosa disminuye la concentración de corticosterona en los grupos S30 y S30/St comparados con los grupos C y St respectivamente ($F_{(1, 1, 31)} = 15.82$, $p < 0.05$; Figura 25A), sin observar modificaciones por la interacción ($F_{(1, 1, 31)} = 0.15$, $p > 0.05$; Figura 25A). La concentración de leptina fue similar entre grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 0.41$, $p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 0.86$, $p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.08$, $p > 0.05$; Figura 25B).

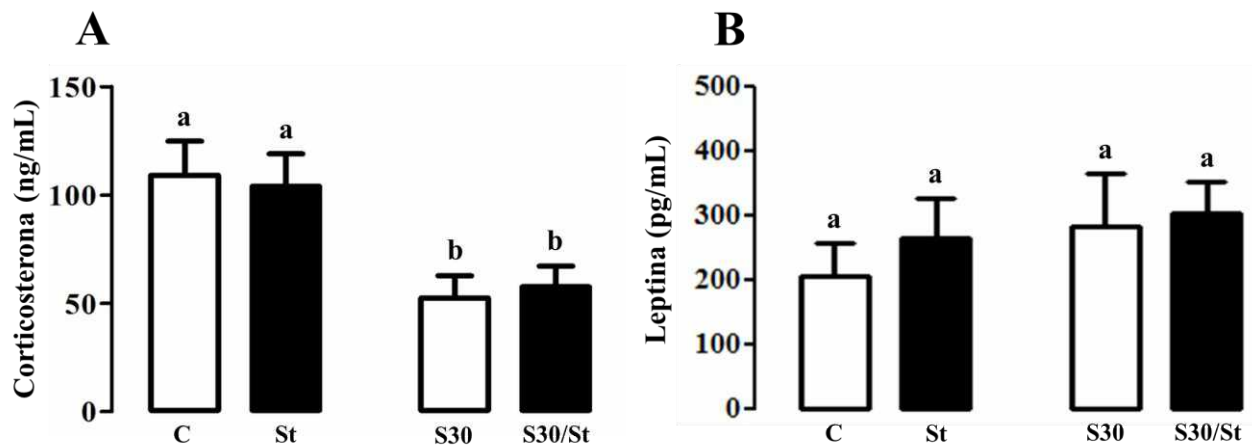


Figura 25. Concentración de Corticosterona. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$. Anova dos vías Newman-Keuls post-hoc. Grupo control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St). (n=8/grupo).

7.3 Tercer mes

7.3.1 Parámetros de crecimiento

Aunque la ganancia de peso corporal muestra diferencias por el estrés cónico ($F_{(1, 1, 31)} = 4.30, p < 0.05$; Tabla4), no observamos diferencias entre grupos ($p > 0.5$), sin observar diferencias por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1, 1, 31)} = 0.08, p > 0.05$; Tabla4) o la interacción ($F_{(1, 1, 31)} = 0.77, p > 0.05$; Tabla4). Aunque el estrés no muestra diferencias significativas en la ingesta de alimento ($F_{(1, 1, 31)} = 3.10, p > 0.05$; Tabla4), el grupo St consume menos alimento respecto al grupo C. Por otro lado, la dieta alta en sacarosa disminuye el consumo de alimento en los grupos S30 y S30/St comparado con los grupos C y St, respectivamente ($F_{(1, 1, 31)} = 129.35, p < 0.05$; Tabla4), sin observar modificaciones por la interacción entre ambos factores ($F_{(1, 1, 31)} = 2.24, p > 0.05$; Tabla4). La ingesta de calorías no muestra diferencias por el estrés crónico ($F_{(1, 1, 31)} = 3.84, p > 0.05$; Tabla4); sin embargo, la dieta alta en sacarosa incrementa la ingesta calórica en los grupos S30 y S30/St comparados con los grupos C y St, respectivamente ($F_{(1, 1, 31)} = 43.15, p < 0.05$; Tabla4), sin observar modificaciones por la interacción entre ambos factores ($F_{(1, 1, 31)} = 0.05, p > 0.05$; Tabla4). El estrés crónico disminuye la ingesta de agua en el grupo St respecto a los grupos C y S30/St ($F_{(1, 1, 31)} = 8.94, p < 0.05$; Tabla4), sin observar diferencias por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1, 1, 31)} = 3.46, p > 0.05$; Tabla4) o la interacción ($F_{(1, 1, 31)} = 1.89, p > 0.05$; Tabla4). Tampoco observamos diferencias en los niveles de glucosa (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 0.04, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 31)} = 2.94, p > 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 0.07, p > 0.05$; Tabla4).

7.3.2 Adiposo Visceral

No observamos diferencias en el índice de adiposidad por el estrés crónico ($F_{(1,1,31)} = 2.24, p > 0.05$; Figura 26A). Sin embargo, la dieta alta en sacarosa incrementa el índice de adiposidad en el grupo S30 respecto a los grupos St y S30/St ($F_{(1, 1, 31)} = 11.86, p < 0.05$; Figura 26A), sin observar diferencias por la interacción ($F_{(1, 1, 31)} = 4.11, p > 0.05$; Figura 26A). Resultados similares se observan con el tejido adiposo visceral (estrés crónico, $F_{(1, 1, 31)} = 7.44, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1, 31)} = 11.39, p < 0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 31)} = 6.12, p > 0.05$; Figura 26B).

Parámetros	C	St	S30	S30/St
Ganancia de peso corporal (g)	244 ±11 ^a	226 ±10 ^a	262 ±17 ^a	217 ±20 ^a
Ingesta de alimento (g/día/100g Peso Corporal)	7 ±0.2 ^a	6 ±0.5 ^b	3 ±0.2 ^c	3 ±0.5 ^c
Ingesta de agua (mL/día/100g Peso Corporal)	23 ±1 ^a	16 ±1 ^b	24 ±2 ^a	21 ±1 ^a
Ingesta calórica (kcal)	25 ±1 ^a	21 ±2 ^a	38 ±3 ^b	34 ±2 ^b
Glucosa (mg/dL)	114 ±3 ^a	111 ±3 ^a	103 ±7 ^a	103 ±7 ^a

Tabla4. Ganancia de peso corporal, ingesta de alimento y agua, ingesta calórica y glucosa. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes diferencias significativas $p<0.05$; ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo).

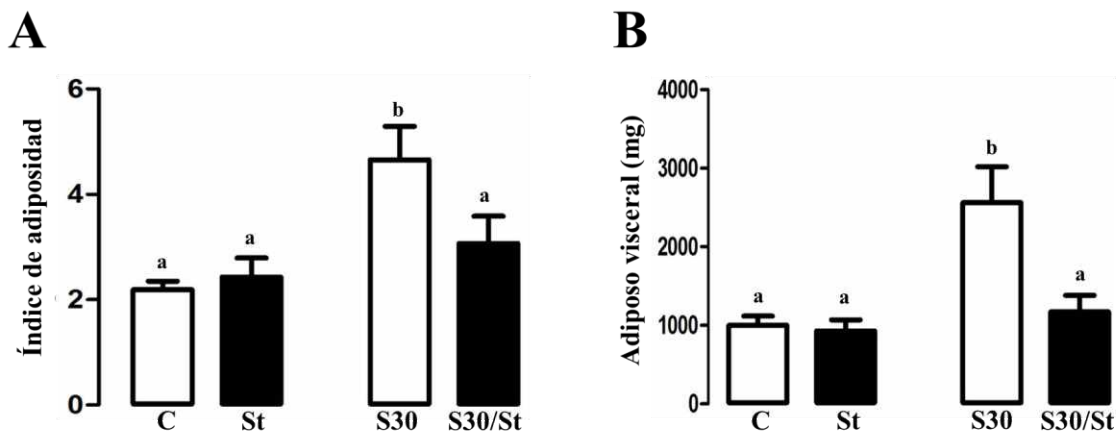


Figura 26. Índice de adiposidad (A) y tejido adiposo visceral (B). Se muestra la media±e.e. Letras diferentes diferencias significativas $p<0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo)

7.3.3 Peso y características histológicas de la glándula adrenal

Peso de la glándula adrenal: El peso de la glándula adrenal aumenta por el estrés crónico (adrenal derecha; $F_{(1, 1, 31)} = 260.48$, $p<0.05$; adrenal izquierda; $F_{(1, 1, 31)} = 353.15$, $p<0.05$; Figura 27A y B), sin observar modificaciones por la dieta alta en sacarosa (adrenal derecha; $F_{(1, 1, 31)} = 0.38$, $p>0.05$; adrenal izquierda; $F_{(1, 1, 31)} = 0.54$, $p>0.05$; Figura 27A y B) o por la interacción (adrenal derecha; $F_{(1, 1, 31)} = 0.38$, $p>0.05$; adrenal izquierda; $F_{(1, 1, 31)} = 0.54$, $p>0.05$; Figura 27A y B).

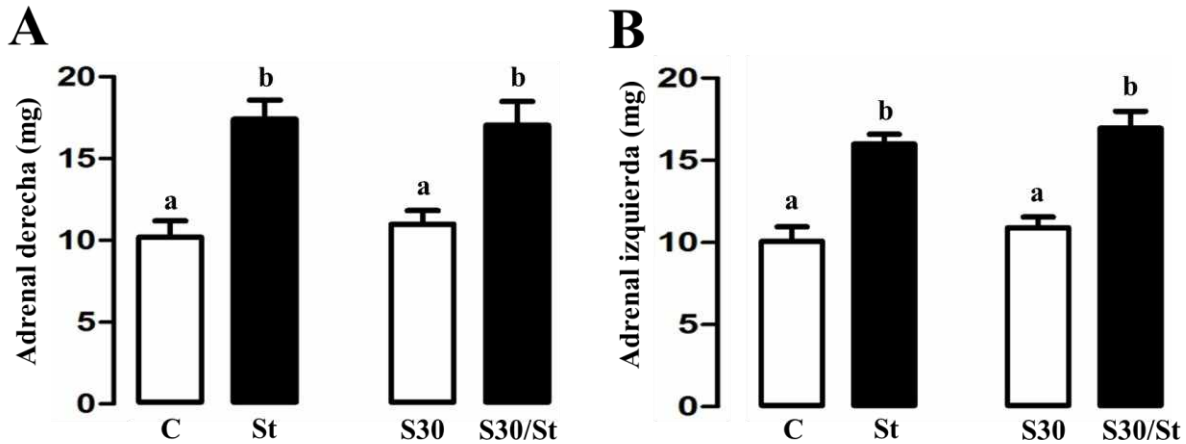


Figura 27. Peso de las glándulas adrenales derecha (A) e izquierda (B) al tercer mes. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, diferencias significativas $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo).

7.3.3.2 Características histológicas de la glándula adrenal

Los núcleos y citoplasma de las células de la corteza de la glándula adrenal derecha e izquierda están bien delimitados (Figura 28A-H). Los núcleos y citoplasmas de la médula adrenal derecha e izquierda están bien delimitados y fueron similares entre grupos (Figura 28L-R), observando la presencia de colágeno en la médula adrenal derecha del grupo S30 (Figura 28K).

Espesor de las capas: El espesor de la Zona Glomerular (ZG), incrementa por el estrés crónico en el grupo St, en comparación con los grupos C y S30/St en la glándula derecha ($F_{(1,1,31)} = 19.97, p < 0.05$; Figura 28S), esta variable incrementa en el grupo St respecto al grupo C en la glándula izquierda ($F_{(1,1,31)} = 5.32, p < 0.05$; Figura 28T). Sin observar modificaciones por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 3.10, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 0.002, p > 0.05$; Figura 28S y T) o la interacción de ambos factores (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 5.96, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 4.82, p > 0.05$; Figura 28S y T). En la zona fascicular (ZF), el estrés crónico no modifica el espesor (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 5.41, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 4.55, p > 0.05$; Figuras 28U y V); la dieta alta en sacarosa disminuye el espesor del grupo S30 respecto a los grupos C y S30/St en la glándula derecha ($F_{(1,1,31)} = 12.58, p < 0.05$; Figura 28U), pero no modifica el espesor de la glándula izquierda ($F_{(1,1,31)} = 0.71, p > 0.05$; Figura 33V), sin observar modificaciones por la interacción (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 1.98, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 0.52, p > 0.05$; Figura 28U y V). El espesor de zona

reticular (ZR), no encontramos diferencias por el estrés crónico (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 3.45$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 2.67$, $p > 0.05$; Figura 28W y X), sin encontrar diferencias por la dieta alta en sacarosa en la glándula derecha ($F_{(1,1,31)} = 1.00$, $p < 0.05$; Figura 28W), pero en la glándula izquierda, la dieta alta en sacarosa disminuye el espesor en los grupos S30 y S30/St comparados con los grupos C y St respectivamente ($F_{(1,1,31)} = 33.23$, $p < 0.05$; Figura 28X). Por otro lado, la interacción disminuye el espesor de la glándula derecha en el grupo S30/St respecto al grupo S30 ($F_{(1,1,31)} = 5.75$, $p < 0.05$; Figura 28W), sin observar diferencias por la interacción en la glándula izquierda ($F_{(1,1,31)} = 0.98$, $p > 0.05$; Figura 28X). El área de la médula, incrementa por el estrés crónico (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 25.08$, $p < 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 31.25$, $p < 0.05$; Figura 28Y y Z), sin observar diferencias por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 0.08$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 3.84$, $p > 0.05$; Figura 28Y y Z), o la interacción de ambos factores (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 0.003$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 1.21$, $p > 0.05$; Figura 28Y y Z).

Densidad celular: En la ZG, la densidad celular incrementa por el estrés crónico en el grupo St respecto al grupo C en la glándula derecha ($F_{(1,1,31)} = 12.60$, $p < 0.05$; Figura 29A), pero en la glándula izquierda no observamos diferencias por el estrés crónico ($F_{(1,1,31)} = 3.30$, $p > 0.05$; Figura 29B). Sin observar diferencias por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 0.67$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 0.006$, $p > 0.05$; Figura 29A y B) o la interacción (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 0.61$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 1.10$, $p > 0.05$; Figura 29A y B). En la ZF, el estrés incrementa la densidad celular en los grupos St y S30+St comparados con el grupo C en la glándula derecha ($F_{(1,1,31)} = 4.35$, $p < 0.05$) y en el grupo St respecto al grupo C en la glándula izquierda ($F_{(1,1,31)} = 20.57$, $p < 0.05$; Figura 29C y D), aunque la dieta alta en sacarosa no muestra diferencias (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 1.00$, $p < 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 0.004$, $p > 0.05$; Figura 29C y D), el grupo S30 presenta más células en comparación con el grupo C en la glándula derecha ($p < 0.05$; Figura 29C), sin observar diferencias por la interacción (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 7.31$, $p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 3.06$, $p > 0.05$; Figura 29C y D). En la ZR, el estrés crónico incrementa la densidad celular en los grupos St y S30/St comparados con los grupos C y S30 respectivamente, en la glándula derecha ($F_{(1,1,31)} = 30.82$, $p < 0.05$; Figura 29E) y en el grupo St respecto al grupo C en la glándula

izquierda ($F_{(1,1,31)} = 12.98, p < 0.05$; Figura 29F), sin observar diferencias significativas por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 2.25, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 0.001, p > 0.05$; Figura 29E y F) o la interacción (glándula derecha, $F_{(1,1,31)} = 2.90, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,31)} = 0.66, p > 0.05$; Figura 29E y F). En la médula derecha, la densidad celular incrementa por el estrés en el grupo St comparado con el grupo C ($F_{(1,1,31)} = 8.36, p < 0.05$; Figura 29G), sin observar diferencias por la dieta alta en sacarosa ($F_{(1,1,31)} = 1.45, p > 0.05$; Figura 34G) o por la interacción ($F_{(1,1,31)} = 3.30, p > 0.05$; Figura 29G). Por otro lado, la densidad celular en la médula adrenal izquierda es similar entre grupos (estrés crónico, $F_{(1,1,31)} = 4.38, p > 0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1,1,31)} = 1.24, p > 0.05$; interacción, $F_{(1,1,31)} = 0.31, p > 0.05$; Figura 29H).

Tamaño de las células: En la ZG, el porcentaje de células en la glándula derecha con una superficie de $< 60 \mu\text{m}^2$ disminuye en el grupo S30, respecto al grupo S30/St ($p < 0.05$; Figura 30A). Por el contrario, el porcentaje de células $> 61 \mu\text{m}^2$ incrementa en el grupo S30, respecto al grupo S30/St ($p < 0.05$; Figura 30A). En la glándula izquierda, el porcentaje de células $< 90 \mu\text{m}^2$ incrementa en el grupo St, comparado con el grupo C ($p < 0.05$; Figura 30B), pero incrementa aún más en el grupo S30/St respecto al grupo St ($p < 0.05$; Figura 30B); sin embargo, el porcentaje de células en esta área disminuye en el grupo S30, respecto a los grupos C y S30/St ($p < 0.05$; Figura 30B). Por el contrario, el porcentaje de células $> 91 \mu\text{m}^2$ disminuye en el grupo St, respecto al grupo C ($p < 0.05$; Figura 30B), pero disminuye aún más en el grupo S30/St comparado con los grupos C y S30 ($p < 0.05$; Figura 30B). Sin embargo, el porcentaje de células en esta área incrementa en el grupo S30, respecto a los grupos C y S30/St ($p < 0.05$; Figura 30B). El porcentaje de células $< 100 \mu\text{m}^2$ en la ZF derecha incrementa en los grupos St y S30/St respecto a los grupos C y S30 respectivamente ($p < 0.05$; Figura 30C). Por el contrario, el porcentaje de células $> 101 \mu\text{m}^2$ disminuye en los grupos St y S30/St, respecto a los grupos C y S30 ($p < 0.05$; Figura 30C). Resultados similares se observaron en la ZF izquierda ($p < 0.05$; Figura 30D). El porcentaje de células $< 60 \mu\text{m}^2$ en la ZR derecha, incrementa en los grupos St y S30/St, con respecto a los grupos C y S30 ($p < 0.05$; Figura 30E). Por el contrario, el porcentaje de células $> 61 \mu\text{m}^2$ disminuye en los grupos St y S30/St, con respecto a los grupos C y S30 ($p < 0.05$; Figura 30E). Resultados similares se observaron en la ZR izquierda ($p < 0.05$; Figura 30F). El porcentaje de

células $<100 \mu\text{m}^2$ en la médula derecha, incrementa en los grupos St y S30/St, con respecto a los grupos C y S30 ($p<0.05$; Figura 30G). Por el contrario, el porcentaje de células $>101 \mu\text{m}^2$ disminuye en los grupos St y S30/St, con respecto a los grupos C y S30 ($p<0.05$; Figura 30G). Resultados similares se observaron en la médula izquierda ($p<0.05$; Figura 30H).

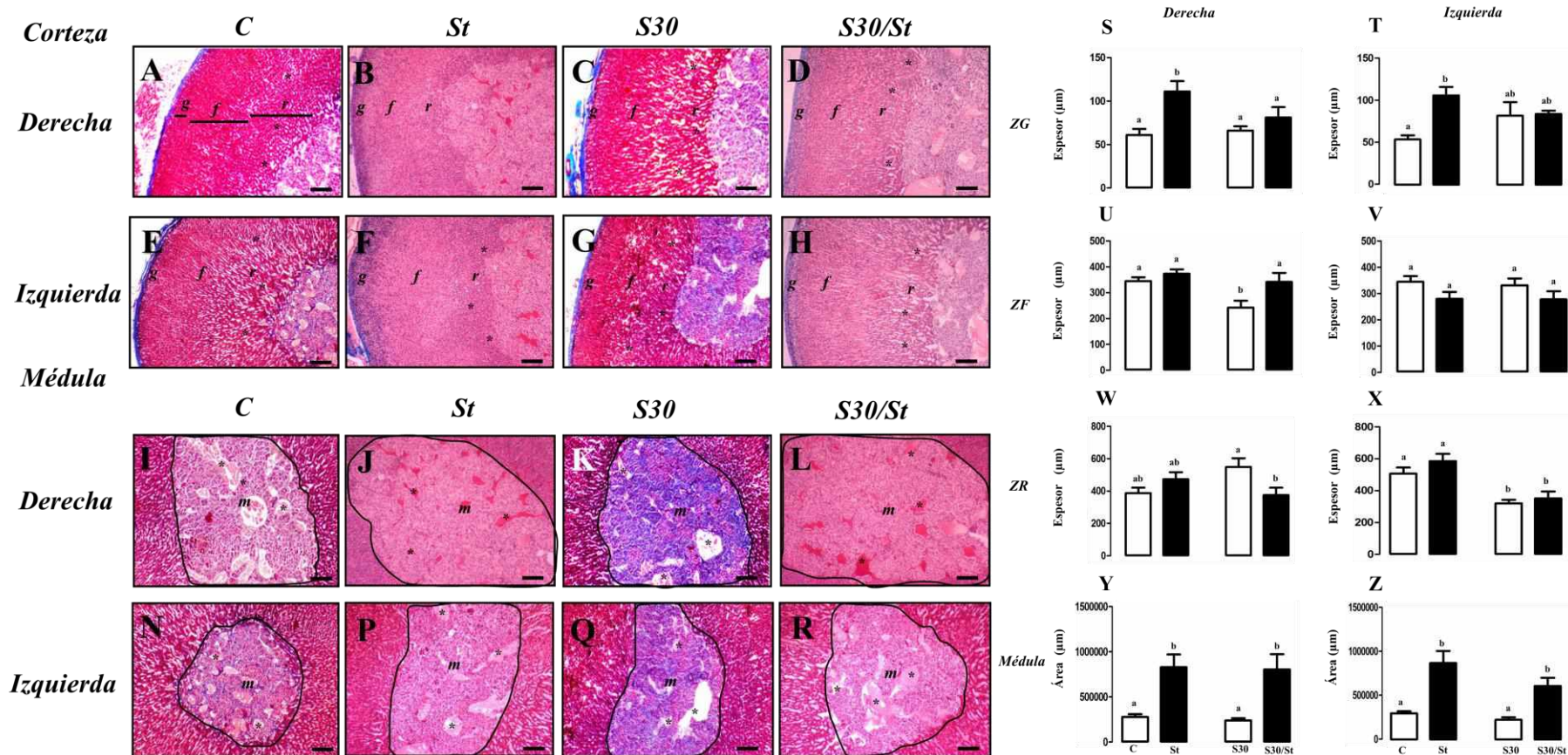


Figura 28. Histología y espesor de la corteza y medula adrenal. Derecha: **A)** Corteza adrenal grupo C; **B)** Corteza adrenal grupo St; **C)** Corteza adrenal grupo S30; **D)** Corteza adrenal grupo S30/St. Izquierda: **E)** Corteza adrenal grupo C; **F)** Corteza adrenal grupo St; **G)** Corteza adrenal grupo S30; **H)** Corteza adrenal grupo S30/St. **Médula** Derecha: **I)** Grupo C; **J)** Grupo St; **K)** Grupo S30; **L)** Grupo S30/St. Izquierda: **N)** Grupo C; **P)** Grupo St; **Q)** Grupo S30; **R)** Grupo S30/St. **Espesor:** **S)** ZG derecha; **T)** ZG izquierda; **U)** ZF derecha; **V)** ZF izquierda; **W)** ZR derecha; **X)** ZR izquierda; **Y)** Médula derecha; **Z)** Médula izquierda. Tricrómica de Masson; *g* zona glomerular; *f* zona fascicular; *r* zona reticular; *m* Médula, *asteriscos* Vasos sanguíneos. Barra=50µm; Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls pos hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=8/grupo).

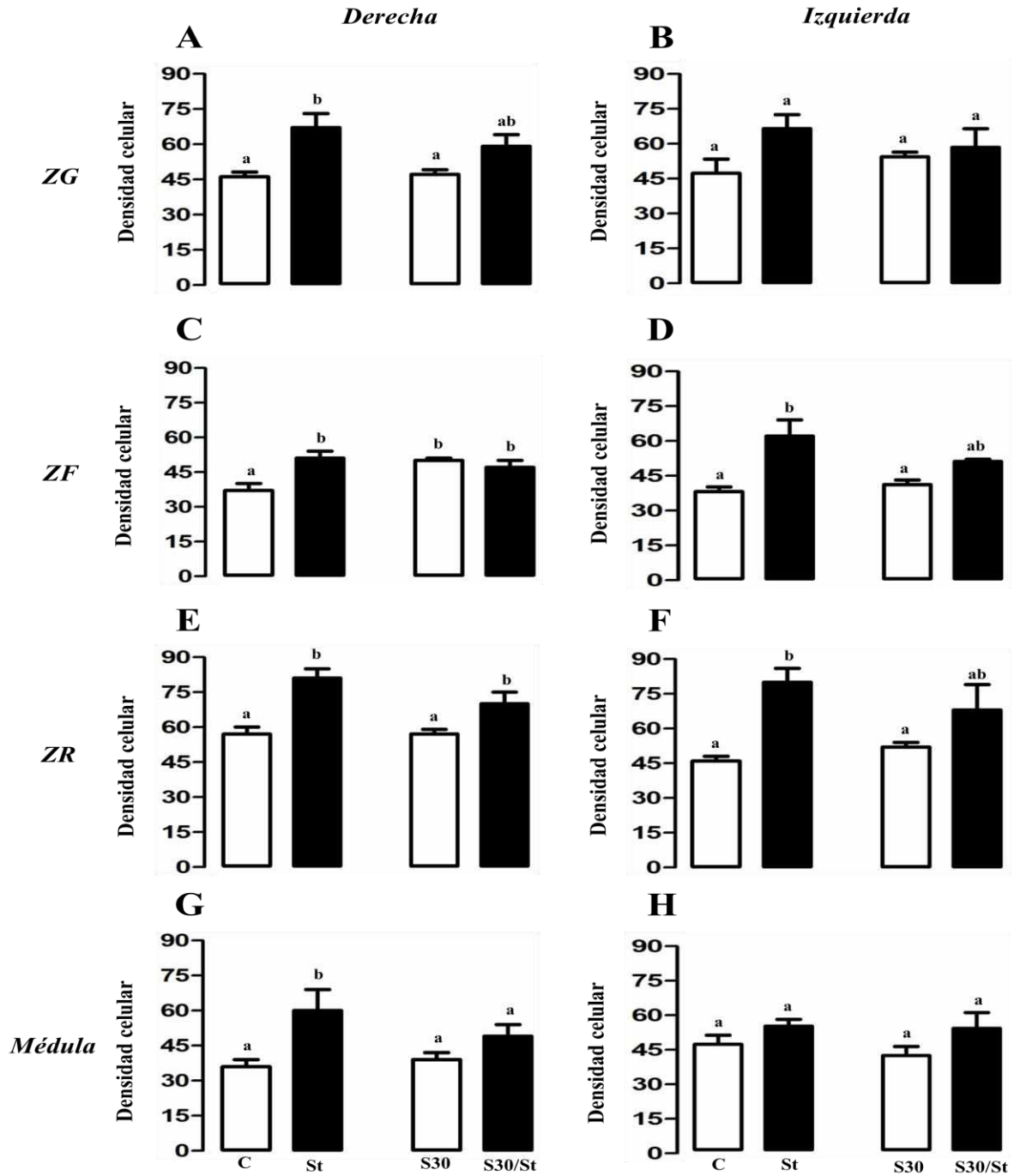


Figura 29. Densidad celular. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls pos hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=6-8/grupo).

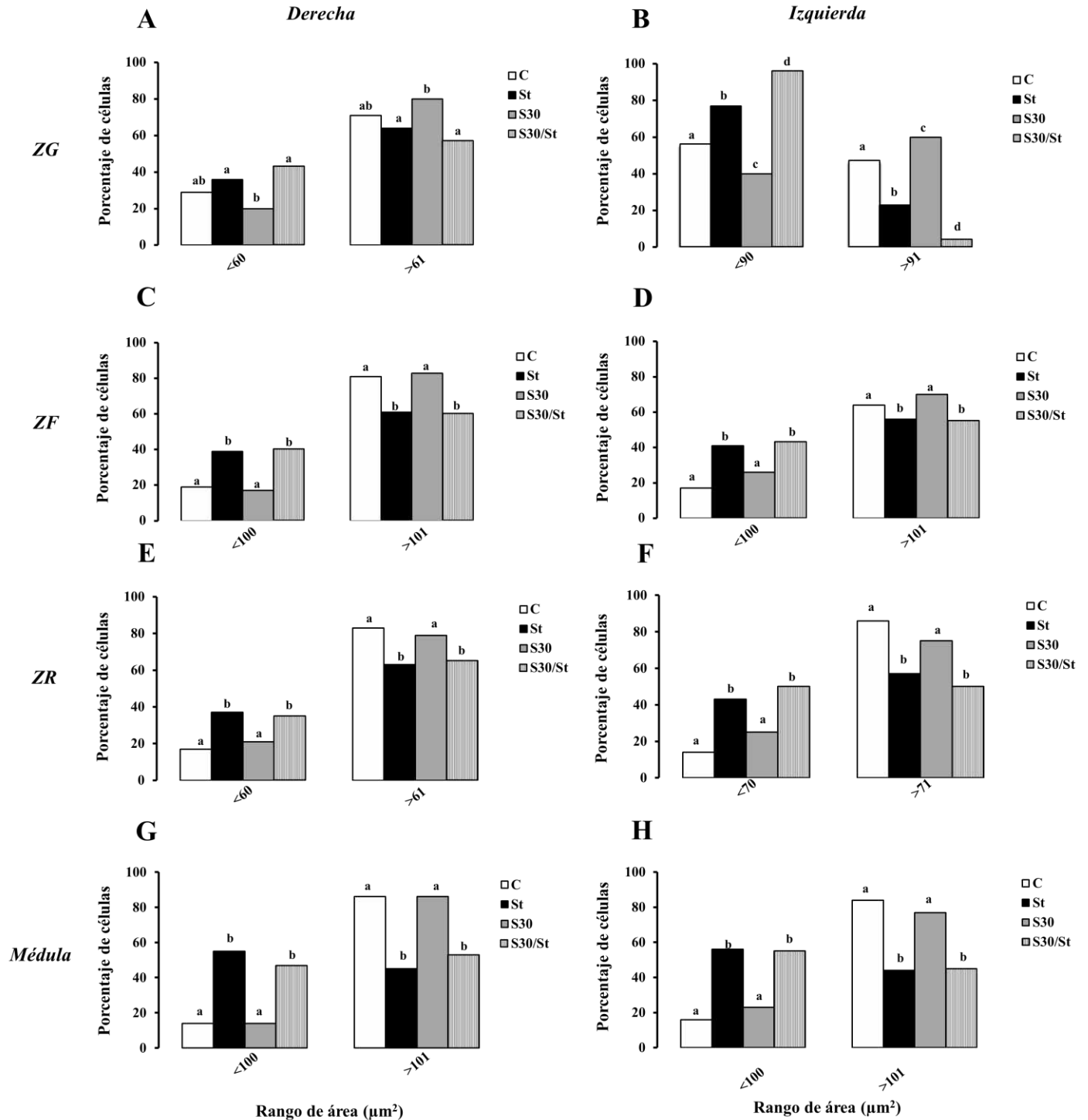


Figura 30. Tamaño de las células. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra el porcentaje de células. Letras diferentes, $p < 0.05$, se realizó una prueba de Chi-cuadrada seguida de una prueba de Fisher Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) ($n=6-8/\text{grupo}$).

Porcentaje de proliferación: En la ZG derecha, el porcentaje de proliferación incrementa por el estrés crónico ($F_{(1,1,23)} = 17.36, p < 0.05$; Figuras 31A). Por otro lado, no observamos diferencias en el porcentaje de proliferación en la ZG de la glándula izquierda por el estrés crónico ($F_{(1,1,23)} = 0.57, p > 0.05$; Figuras 31B), ni por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1,1,23)} = 1.10, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,23)} = 6.44, p > 0.05$; Figuras 31A y B) o por la interacción entre ambos factores (glándula derecha, $F_{(1,1,23)} = 0.15, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,23)} = 0.17, p > 0.05$; Figuras 31A y B). En la ZF derecha, el estrés crónico incrementa el porcentaje de proliferación en los grupos St y S30/St, comparados con los grupos C y S30, respectivamente ($F_{(1,1,23)} = 17.78, p < 0.05$; Figura 31C), sin observar diferencias por el estrés crónico en la glándula izquierda ($F_{(1,1,23)} = 2.25, p > 0.05$; Figura 31D), ni por la dieta alta en sacarosa en la glándula derecha ($F_{(1,1,23)} = 2.66, p > 0.05$; Figura 31C). Sin embargo, el porcentaje de proliferación incrementa por la dieta alta en sacarosa en los grupos S30 y S30/St comparados con los grupos C y St, respectivamente, en la glándula izquierda ($F_{(1,1,23)} = 8.51, p < 0.05$; Figura 31D), sin observar diferencias por la interacción (glándula derecha, $F_{(1,1,23)} = 0.001, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,23)} = 0.84, p > 0.05$; Figura 31C y D). En la ZR, el estrés crónico incrementa el porcentaje de proliferación en el grupo S30/St respecto al grupo St y S30 ($F_{(1,1,23)} = 23.75, p < 0.05$; Figura 31E), y en la glándula izquierda respecto al grupo St ($F_{(1,1,23)} = 8.79, p < 0.05$; Figura 31F), no observamos diferencias por la dieta alta en sacarosa en la glándula derecha ($F_{(1,1,23)} = 10.25, p > 0.05$; Figura 31E), pero la dieta alta en sacarosa incrementa el porcentaje de proliferación en el grupo S30 respecto al grupo C en la glándula izquierda ($F_{(1,1,23)} = 8.79, p < 0.05$; Figura 31F), sin observar diferencias por la interacción (glándula derecha, $F_{(1,1,23)} = 3.98, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,23)} = 0.021, p > 0.05$; Figura 31E y F). No observamos diferencias por el estrés crónico en la médula (glándula derecha, $F_{(1,1,23)} = 1.65, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,23)} = 4.40, p > 0.05$; Figura 31G y H), ni por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1,1,23)} = 0.16, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,23)} = 0.40, p > 0.05$; Figura 31G y H) o por la interacción (glándula derecha, $F_{(1,1,23)} = 1.95, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,23)} = 6.69, p > 0.05$; Figura 31G y H).

Vasos sanguíneos: En la ZR, el estrés crónico disminuye el área cubierta por los vasos sanguíneos en el grupo S30/St comparado con el grupo S30 en la glándula derecha ($F_{(1,1,23)} =$

0.40, $p>0.05$; Figura 32A), y el grupo St respecto al grupo C en la glándula izquierda ($F_{(1, 1, 23)} = 29.39$, $p<0.05$; Figura 32B), en la glándula derecha, la dieta alta en sacarosa incrementa el área cubierta por los vasos sanguíneos en el grupo S30 respecto al grupos S30/St ($F_{(1,1,23)} = 7.37$, $p<0.05$; Figura 32A), pero disminuye en el grupo S30 respecto al grupo C en la glándula izquierda ($F_{(1,1,23)} = 2.96$, $p<0.05$; Figura 32B), sin observar diferencias por la interacción (glándula derecha, $F_{(1,1,23)} = 0.13$, $p>0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,23)} = 16.29$, $p<0.05$; Figura 32A y B). En la médula, el estrés crónico disminuye el área cubierta por los vasos sanguíneos (glándula derecha, $F_{(1,1,23)} = 27.74$, $p<0.05$; glándula izquierda, $F_{(1,1,23)} = 101.67$, $p>0.05$; Figura 32C y D), pero no hubo diferencias por la dieta alta en sacarosa en la glándula derecha ($F_{(1,1,23)} = 0.004$, $p>0.05$; Figura 32C), pero la dieta alta en sacarosa disminuye el área cubierta por los vasos en el grupo S30 respecto al grupo C ($F_{(1,1,23)} = 10.02$, $p>0.05$; Figura 32D), sin observar cambios por la interacción (glándula derecha, $F_{(1,1,23)} = 0.00009$, $p>0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 4.46$, $p>0.05$; Figura 32C y D).

Infiltración de células inmunes: El número de células inmunes en los vasos sanguíneos de la ZG derecha, disminuye por el estrés crónico en el grupo S30/St con respecto al grupo S30 ($F_{(1, 1, 23)} = 9.37$, $p<0.05$; Figura 33A), aunque la variable de estrés crónico muestra diferencias significativas en el número de células inmunes en la glándula izquierda ($F_{(1, 1, 23)} = 11.38$, $p<0.05$; Figura 33B), no observamos diferencias entre grupos. Por otro lado, aunque, la dieta alta en sacarosa no muestra diferencias (glándula derecha ($F_{(1, 1, 23)} = 0.40$, $p>0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 3.51$, $p>0.05$; Figura 33A y B), el número de células inmunes es mayor en el grupo S30 respecto a los grupos C y S30/St en la glándula izquierda ($p<0.05$; Figura 33A), sin observar diferencias por la interacción (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 2.05$, $p>0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 1.65$, $p>0.05$; Figura 33A y B). En la ZF, no observamos diferencias por el estrés crónico en la glándula derecha ($F_{(1, 1, 23)} = 3.79$, $p>0.05$; Figura 33C), por otro lado, aunque el estrés crónico muestra diferencias significativas en la glándula izquierda ($F_{(1, 1, 23)} = 18.31$, $p<0.05$; Figura 33D), no observamos diferencias entre grupos. Aunque, no observamos diferencias por la dieta alta en sacarosa (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 0.18$, $p>0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 2.52$, $p>0.05$; Figura 33C y D), el número de células inmunes es mayor en el grupo S30 respecto al grupo S30/St en la glándula izquierda ($p<0.05$; Figura 33D), sin

observar diferencias por la interacción (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 2.40, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 0.73, p > 0.05$, Figura 33C y D). En la ZR, no observamos diferencias significativas en el número de células inmunes por el estrés crónico (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 5.03, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 5.90, p > 0.05$; Figura 33E y F). La dieta alta en sacarosa, no proporciona diferencias significativas en el número de células inmunes en la glándula derecha ($F_{(1, 1, 31)} = 0.04, p > 0.05$; Figura 33E) Por otro lado, aunque observamos diferencias por la dieta alta en sacarosa en la glándula izquierda ($F_{(1, 1, 23)} = 5.99, p < 0.05$; Figura 33F), no observamos diferencias entre grupos. Sin observar diferencias por la interacción (glándula derecha, $F_{(1, 1, 31)} = 2.06, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 0.22, p > 0.05$; Figura 33E y F). En la médula, aunque el número de células inmunes muestra diferencias por el estrés crónico en la glándula derecha ($F_{(1, 1, 23)} = 23.50, p < 0.05$; Figura 33G), no observamos diferencias entre grupos, por el contrario el estrés crónico disminuye el número de células inmunes en los grupos St y S30/St comparados con los grupos C y S30, respectivamente en la glándula izquierda ($F_{(1, 1, 23)} = 48.52, p < 0.05$; Figura 33H). El número de células inmunes incrementa por la dieta alta en sacarosa en el grupo S30, respecto a los grupos C y S30/St (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 7.14, p < 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 5.39, p < 0.05$; Figura 33G y H). Sin observar diferencias por la interacción (glándula derecha, $F_{(1, 1, 23)} = 11.02, p > 0.05$; glándula izquierda, $F_{(1, 1, 23)} = 3.24, p > 0.05$; Figura 33G y H).

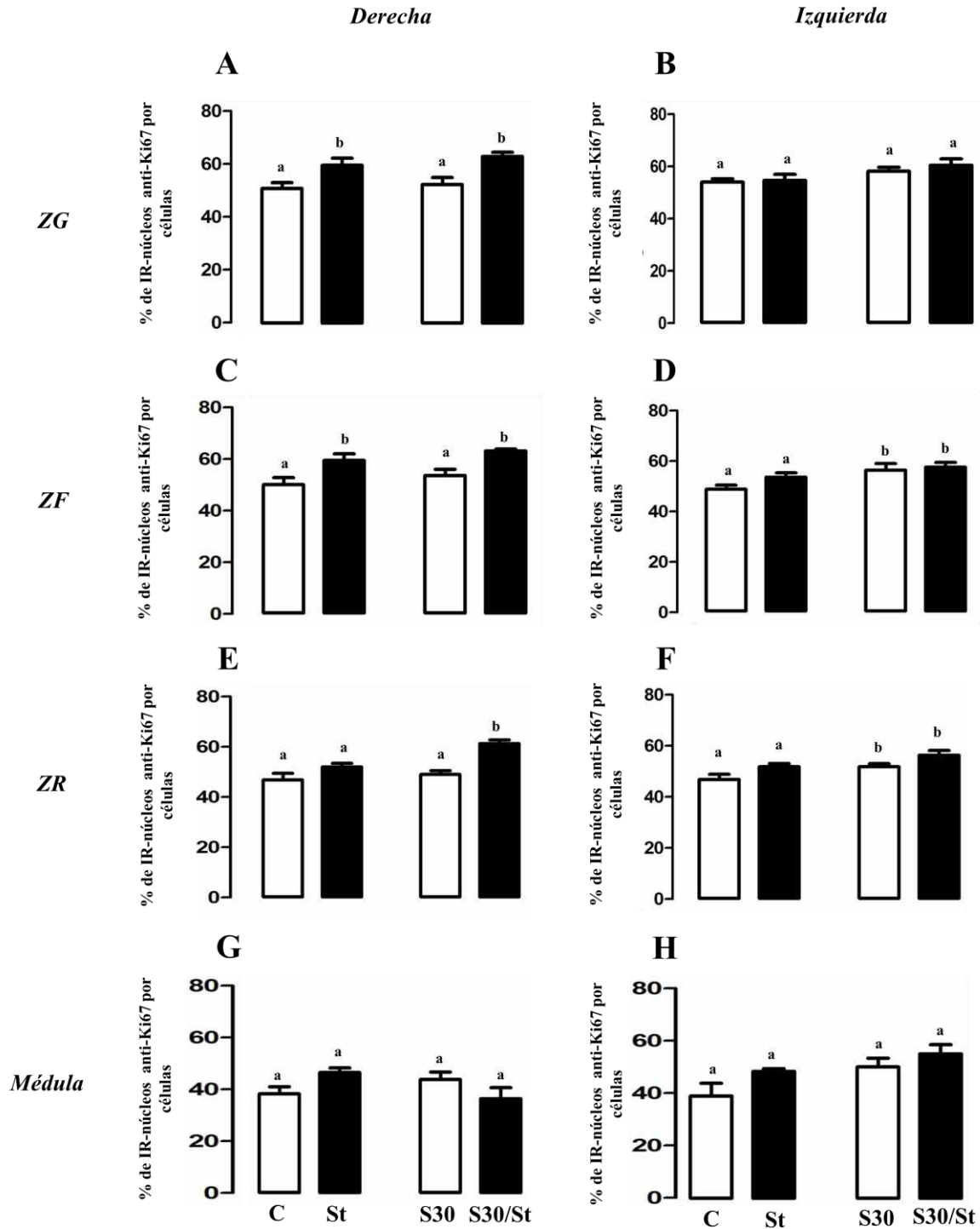


Figura 31. Porcentaje de proliferación. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra la media±e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post- hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=6-8/grupo).

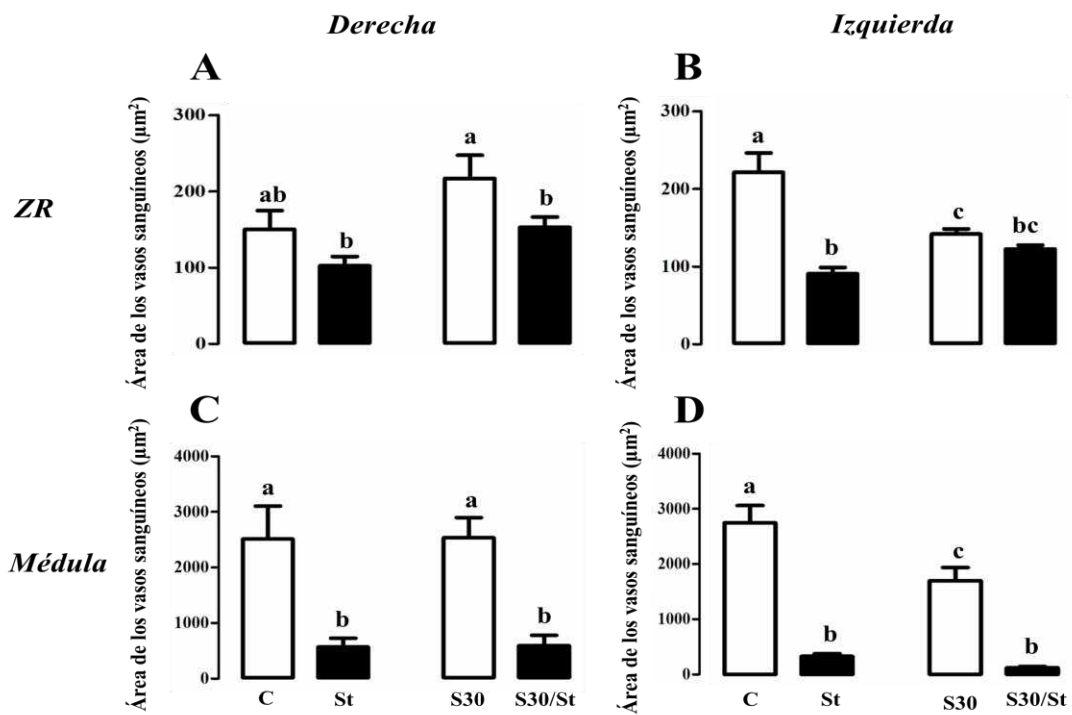


Figura 32. Vasos sanguíneos. A) ZR derecha; B) ZR izquierda; C) Médula derecha; D) Médula izquierda. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls post-hoc. Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=6-8/grupo).

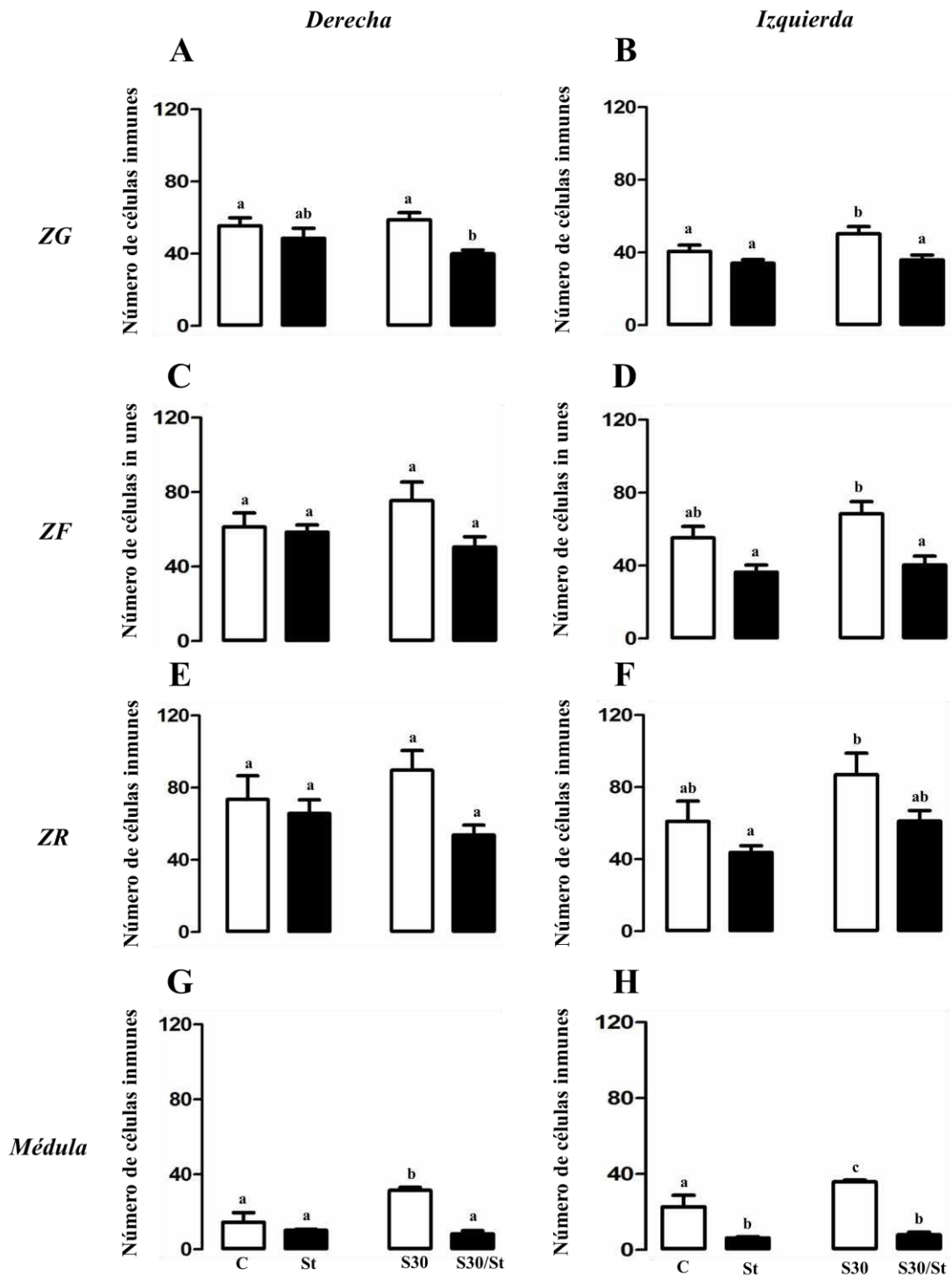


Figura 33. Infiltración de células inmunes. A) ZG derecha; B) ZG izquierda; C) ZF derecha; D) ZF izquierda; E) ZR derecha; F) ZR izquierda; G) Médula derecha; H) Médula izquierda. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p < 0.05$, ANOVA de dos vías Neman-Keuls pos hoc Control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St) (n=6-8/grupo).

7.3.4 Parámetros Hormonales

Las concentraciones de corticosterona fueron similar entre los cuatro grupos (estrés crónico, $F_{(1, 1, 23)}=0.19, p>0.05$; dieta alta en sacarosa, $F_{(1, 1, 23)}=1.06, p>0.05$; interacción, $F_{(1, 1, 23)}=0.52, p>0.05$; Figura 34A). Por otro lado, el estrés crónico no modifica las concentraciones de leptina ($F_{(1, 1, 31)}=1.72, p>0.05$; Figura 34B), pero la dieta alta en sacarosa incrementa la concentración de leptina en el grupo S30 comparado con los grupos C, St, y S30/St ($F_{(1, 1, 31)}=48.97, p<0.05$; Figura 34B), sin observar modificaciones por la interacción de ambos factores ($F_{(1, 1, 31)}=16.14, p>0.05$; Figura 34B).

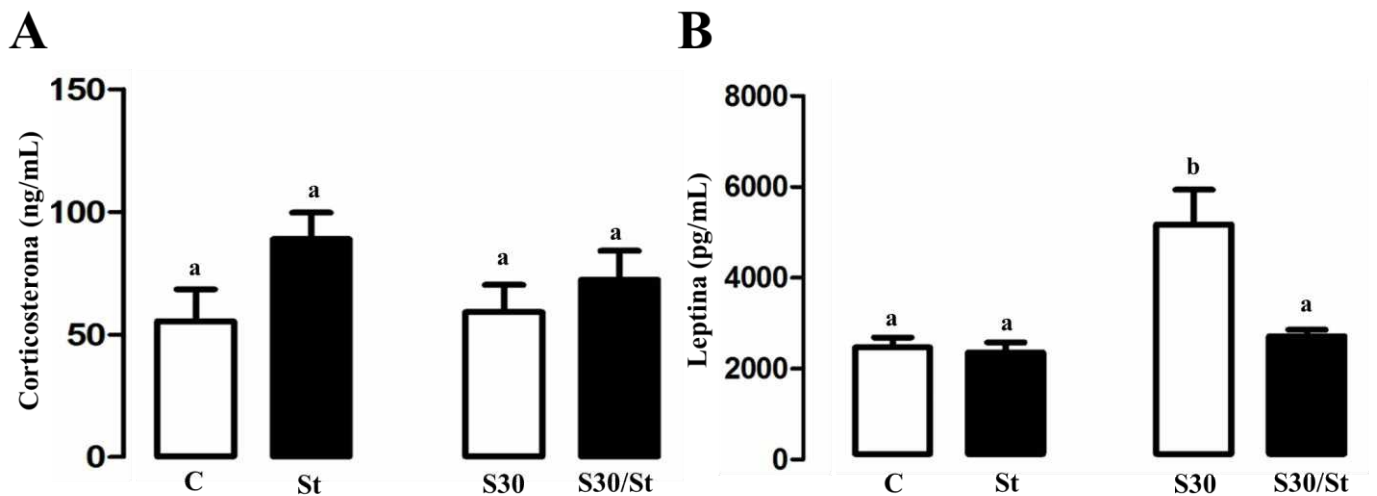


Figura 34. Parámetros hormonales. A) Corticosterona, B) Leptina. Se muestra la media \pm e.e. Letras diferentes, $p<0.05$. Anova dos vías Newman-Keuls post-hoc. Grupo control (C), estrés (St), sacarosa al 30% (S30), sacarosa al 30% más estrés (S30/St). (n=6-8/grupo).

8 DISCUSIÓN

Tanto en seres humanos como en modelos animales, se ha observado que estresores crónicos provocados por el estilo de vida causan cambios fisiológicos y también trastornos neuroendocrinos y fisiológicos (Fernando y cols. 2013; Bali y Jaggi 2015), donde varios órganos o tejidos metabólicos están involucrados, por ejemplo: el páncreas, el hígado, los riñones, el cerebro, la musculatura estriada, pero pocos trabajos han reportado que la glándula adrenal también es importante para entender dichos mecanismos (De Silva and Wijesiriwardene 2007). Del mismo modo, dietas ricas en carbohidratos inducen trastornos metabólicos (Martinez Calejman y cols. 2012; Díaz-Aguila y cols. 2016). Por otro lado, con la combinación de ambos factores, la dieta alta en sacarosa puede contrarrestar los efectos del estrés (Urich-Lai y cols 2007; Corona-Pérez y cols. 2015).

Nuestros resultados muestran que la exposición de estrés por un mes no afecta el peso corporal, la ingesta de alimentos, el índice de adiposidad ni el tejido adiposo visceral, en ratas macho recién destetados. Estos resultados son similares con otros estudios realizados en roedores, en los que el estrés crónico no afecta estas variables (Arcego y cols. 2014, de Oliveira y cols. 2014). El consumo de 30% de sacarosa durante 4 semanas redujo la ingesta de alimento sólido y no afecta la ganancia de peso corporal en el período inmediatamente después del destete, lo que se ha reportado es que se promueve el aumento peso durante el periodo postpubertad (Velkoska y cols. 2008; Fuente-Martín y cols. 2012). En contraste con ratas jóvenes macho, el consumo de sacarosa aumenta la acumulación de grasa visceral en edad adulta (Cervantes-Rodríguez y cols. 2014; Díaz-Aguila y cols. 2016). Es bien sabido que el estrés crónico aumenta los niveles de corticosterona en suero (Levin y cols. 2000). Nuestros resultados también muestran que el consumo de 30% de sacarosa durante 4 semanas no altera la concentración de corticosterona en suero, pero es capaz de bloquear el efecto hipercortisolémico causado por el estrés crónico en ratas macho jóvenes. Tal modulación de la respuesta al estrés por la ingesta de hidratos de carbono ha sido informado anteriormente (Levin y cols. 2000; Macedo y cols. 2012). Ratas estresadas sometidos a una dieta hipercalórica son hiporesponsivas haciendo hincapié en base a una reactividad reducida (Levin y cols. 2000), que está de acuerdo con la concentración de corticosterona sérica exhibida por el grupo S30/St. Otros autores han demostrado las acciones moduladoras, neuroendocrinas, metabólicas y de comportamiento a la respuesta al estrés de la

ingesta basal de carbohidratos (Laugero y cols. 2002; Pecoraro y cols. 2004). El aumento de la ingesta de comida palatable inducida por glucocorticoides (Pecoraro y cols. 2005) se ha asociado con la alimentación basada en recompensa, que se ha sugerido como un medio para reducir la respuesta al estrés (Adam y Epel 2007). Este punto podría ser también importante para la regeneración de glucocorticoides en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal en función de algunos aspectos de balance de energía. Por lo tanto, cualquier cosa que altere la energía equilibrada, antes, durante o después del estrés, podría también alterar la fisiología del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y otros sitios sensibles a glucocorticoides en el sistema nervioso central.

Aunque el estrés crónico y la dieta alta en sacarosa no aumentan el peso de la glándula adrenal, se observó un efecto sinérgico claro por la combinación de ambos factores en la glándula adrenal derecha. El peso adrenal depende de la intensidad y el tiempo en que se aplica el factor de estrés (Chennaoui y cols. 2002; Retana-Marquez y cols. 2003). Nuestra observación corrobora algunos hallazgos de estudios previos, en los que los protocolos de estrés duradero, severo o largo, afectan el peso adrenal (Martí y cols. 1994; Marin y cols. 2007). Usando el mismo protocolo; de restricción de estrés crónico, pero durante 6 semanas, se observa un incremento en el peso de las glándulas adrenales, pero sin cambios en el nivel de corticosterona (Macedo y cols. 2012). En ratas adultas, una ingesta rica en sacarosa (Díaz-Aguila y cols. 2016) o una dieta alta en grasa (Bruder-Nascimento y cols. 2013) no modifican el peso de la glándula adrenal ni los niveles de corticosterona. El aumento de peso adrenal también puede ser un signo de insuficiencia adrenal. En cuanto a la morfometría de la glándula adrenal, nuestros resultados mostraron que el estrés conduce a la hipertrofia de la glándula adrenal en función de la zona y la lateralidad. Este efecto fue más notable en el espesor de la ZG y ZF en ambas glándulas. Estos resultados concuerdan con otros estudios realizados en roedores que proponen que la exposición al estrés reduce el espesor de la ZF adrenal con una compensación de la ZR adrenal (Oliveira y cols. 2009; Gannouni y cols. 2014.). Estos cambios morfológicos podrían estar relacionados con una excesiva liberación de catecolaminas y corticosterona (Zheng y cols. 1997; Soldani y cols. 1999) o por aumento de los niveles de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) como lo observado en humanos expuestos a estrés agudo por ruido (Testa y cols. 1994). Por otra parte, los cambios histológicos observados en la glándula adrenal podrían estar asociados con un aumento

en los niveles de corticosterona en ratas adultas (Koko y cols. 2004) y juveniles (Corona-Pérez y cols. 2015). El alto consumo de sacarosa por un período más largo reduce el espesor de la zona fasciculada, pero no cambia los niveles de corticosterona (Díaz-Aguila y cols. 2016). Por su parte, la disminución del espesor se ha relacionado con una reducción en el contenido de gotitas de lípidos intracelulares (Lorente y cols. 2002; Oliveira y cols. 2009). En condiciones de hiperglucemia, especialmente la diabetes tipo 2, la actividad del eje HPA y la producción hormonal de la corteza adrenal se ve afectada (Elahi-Moghaddam y cols. 2013). Esto puede conducir a la incidencia de la disfunción secundaria en la actividad de otras glándulas endocrinas y posteriormente, de exacerbación y de complicaciones de la enfermedad si no se logra el control de la glucosa en sangre (Barber y cols. 2003). Estos cambios diferentes en el espesor de las zonas podrían estar relacionados con modificaciones en la densidad de las células, el tamaño de las células y la presencia de sinusoides. En los animales estresados, la glándula adrenal es funcional y, si la estimulación de ACTH es suficiente para causar la hipertrofia aumentando la secreción de glucocorticoides (Harvey 2016). Por el contrario, la disminución de la densidad celular en el ZF podría estar asociado con bajos niveles de corticosterona y ACTH (Malendowicz y cols. 2000) o con hipotiroidismo (Sarwar y Janjua 2003). La producción crónica de ACTH junto con la hiperplasia de la corteza adrenal observada en la enfermedad de Cushing's podría tener efectos sobre la regulación de la proliferación celular (Ferreira y cols. 2007). Es importante mencionar que la proliferación celular no se vio afectada la glándula adrenal por el estrés. La estimulación de la proliferación celular en el ZF y la secreción de corticosterona se producen preferentemente después del tratamiento de ACTH (Miyamoto y cols. 1999). Tal vez es necesario tener unos altos niveles de ACTH para inducir la proliferación celular en la ZF (Engeland y Levay-Young 1999, Miyamoto y cols. 1999). Sin embargo, la ingesta de alta sacarosa fue capaz de aumentar la proliferación celular en ZG derecha y para reducir la proliferación celular en la ZG izquierda. La proliferación celular de la ZG aumenta en paralelo con el aumento de la secreción de aldosterona en respuesta a una dieta baja en sodio (McEwan y cols. 1996). De acuerdo con la teoría de la migración de células de la corteza adrenal, afirma que la proliferación celular se produce en el ZG, o en la zona intermedia entre ZF y ZG, y, ya que las células se diferencian, se mueven de forma centripeta y mueren en la ZR, en la que se eliminan por los macrófagos (Long 1975), esto

podría perjudicar la migración celular en la corteza suprarrenal y el crecimiento de nuevas células hacia la médula (Wolkersdörfer y Bornstein 1998). El tejido adrenal representa un sistema de renovación celular en el que la remodelación estructural de adaptación se consigue mediante un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis (Leblond 1964). Es posible que la inhibición de la proliferación celular es inducida por el estrés oxidativo generado por la alta glucosa, lo que podría ser de gran importancia para su función fisiológica que afecta a la producción de esteroides en las células adrenales (Astort y cols. 2009). Además, la ingesta rica en sacarosa en ratas jóvenes estresados, reduce el nivel de corticosterona en suero (Corona-Pérez y cols. 2015) y, probablemente, la falta de ACTH inhibe la proliferación celular (Stachowiak y col. 1990). El área de los vasos sanguíneos de la ZR derecha se vio afectado por el estrés y en la ZR izquierda se vio afectada por la ingesta de alta sacarosa, y en la médula adrenal se ven afectados por ambos factores. Se observó una mezcla de vasos de gran calibre y vasos de pequeño calibre, y estos cambios en los patrones vasculares probablemente reflejan la secreción de factores angiogénicos (Magennis y McNicol 1998). Se ha informado que la presencia de más vasos sanguíneos en las glándulas adrenales de ratas estresadas se podría considerar como una indicación de la atrofia de la glándula adrenal (Johnson y DiPietro, 2013). La ACTH controla el desarrollo coordinado de la vasculatura mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; Vittet y cols. 2000; Thomas y cols. 2003), que es esencial para la angiogénesis y la permeabilidad vascular. Sin embargo, el estrés crónico podría cambiar las señales proangiogénicos causando insuficiencia de los vasos sanguíneos (Binet y Sapielha 2015), lo que podría causar hipoxia y la privación de nutrientes de la célula. Probablemente, la inhibición de la proliferación en la ZG izquierda podría estar asociada con una disminución de los vasos sanguíneos como resultado de la disminución de los niveles de corticosterona y ACTH inducida por la ingesta alta en sacarosa en ratas jóvenes estresadas (Pyter y cols. 2014), aunque no hay diferencias en los vasos sanguíneos pequeños de la ZF y ZR en comparación con los controles no estresados (Koko y cols. 2004). Sin embargo, la inyección de etanol, dilata los vasos sanguíneos pequeños en ZF y ZR (Milovanović y cols. 2003), lo que sugiere una respuesta diferente para diferentes factores de estrés. El estrés crónico parece aumentar las células inmunes únicamente en la glándula adrenal izquierda en la corteza adrenal lo que sugiere un proceso inflamatorio,

mientras que la reduce en la médula. En pacientes con síndrome de Cushing's se ha observado una actividad linfocítica importante y una infiltración de leucocitos en la glándula adrenal (Jennewein y cols. 2015). Además, el estrés crónico aumenta la producción de citoquinas en la glándula adrenal y la esteroidogénesis adrenal (Bornstein y cols. 2004), lo que favorecería el aumento en la concentración de corticosterona. Por el contrario, la falta de hormonas suprarrenales inhibe la función inmune innata (Yang y cols. 2011). Finalmente, el estrés crónico no afecta los niveles séricos de leptina, resultados similares a los observados en estudios previos (Bruder-Nascimento y cols. 2013; Macedo y cols. 2012). Sin embargo, la dieta alta en sacarosa favorece una hiperleptinemia solamente en el grupo S30, lo que se correlaciona con la cantidad de grasa corporal (Ainslie y cols. 2000; Cervantes-Rodríguez y cols. 2014), resultados consistentes a los observados en animales que reciben dieta hipercalórica (Macedo y cols. 2012) o con alto contenido de grasa (Bruder-Nascimento y cols. 2013). Si bien es cierto que, la leptina aumenta la producción de CRH, incrementa la síntesis de glucocorticoides en la glándula adrenal, y favorece la síntesis de epinefrina y norepinefrina en la medula adrenal, para la respuesta al estrés (Trevenzoli y cols. 2010). También se ha sugerido, que la leptina inhibe la esteroidogénesis en la glándula adrenal de dos formas; la primera: disminuyendo la producción de SF-1 factor de transcripción implicado en la inducción de la proteína StAR (Walker y cols. 2004), y la segunda inhibiendo la expresión de la citocromo P450_{scc} y de la citocromo P450_{c21} esteroide hidroxilasa (Bornstein y cols. 1997), mientras, que los glucocorticoides regulan la expresión del mRNA de gen OB en tejido adiposo, sin conocer claramente dicho mecanismo (Slieker y cols. 1996). Debido a esto, es posible que nosotros no tenemos en los resultados niveles altos de corticosterona en los animales que consumen sacarosa, ni tampoco niveles de leptina alta en los animales estresados, mientras, que la combinación de ambos factores mantienen un equilibrio entre dichas hormonas. En este fase se puede concluir que el estrés en la vida postnatal temprana provoca una desorganización de la morfometría adrenal, también la ingesta alta de sacarosa disminuye el área de los vasos sanguíneos e inhibe la proliferación celular, lo que sugiere que la exposición prolongada al estrés y la ingesta de agua de azúcar puede contribuir a las enfermedades metabólicas en la vida adulta. Es necesario tomar medidas preventivas para disminuir el estrés y el consumo de bebidas endulzadas con azúcar en la infancia.

2do mes

Nuestros resultados al segundo mes, muestran que el estrés disminuye la ganancia de peso corporal y la ingesta de alimento, consistente a lo reportado previamente (Ricart-Jané y cols. 2002; Adan y Epel. 2007). Respecto a esto, se ha reportado que ante una situación de estrés, incrementa la liberación de CRH y noradrenalina, las cuales poseen una acción inhibitoria sobre el apetito provocando efectos anoréxicos que conllevan a la disminución del consumo de alimento y por ende a la pérdida de peso corporal (Dallman y cols. 2004; Bazhan y Zelena 2013). Sin embargo, la ingesta de alimento y la ganancia de peso corporal varían dependiendo del tipo, intensidad y duración del estrés (Foster y cols. 2006; Fachin y cols. 2008). En el caso de los animales que consumieron agua con sacarosa, no encontramos diferencias en el peso corporal, a pesar de que disminuye el consumo de alimento y de que no incrementa el tejido adiposo visceral, esto puede ser debido a que a diferencia de lo observado en edad adulta donde el exceso de calorías obtenidas por la ingesta de agua, favorece el aumento de tejido adiposo visceral, en edad juvenil este exceso de calorías es utilizada para mantener el equilibrio de las funciones metabólicas y hormonales que necesita el individuo para su desarrollo, por lo cual a pesar de tener un exceso proveniente de la ingesta de agua este no se almacena como en edad adulta. Respecto a los animales que estuvieron sometidos a los dos estímulos (dieta alta en sacarosa más estrés crónico), disminuye la ganancia de peso corporal y la ingesta de alimento, esto puede atribuirse a que el estrés estimula la secreción de niveles altos de catecolaminas (Altuna y cols. 2006) a través del sistema nervioso autónomo simpático, promoviendo la lipólisis en tejidos periféricos (Fachin y cols. 2008; Torres y Nowson 2007), por ello, el exceso de calorías contenidas en el agua con sacarosa no se están almacenando, debido a que el estrés crónico bloquea los efectos de la dieta alta en sacarosa, evitando la ganancia de peso corporal, así como la acumulación de grasa visceral, resultados similares a lo reportado previamente (Macedo y cols. 2012; Corona-Pérez y cols. 2015). El estrés crónico no aumenta la concentración de corticosterona en suero, como lo observado en estudios previos (Macedo y cols. 2012; Rostamkhani y cols. 2012), esto es debido a que los niveles de corticosterona disminuyen a medida que el animal se adapta a los factores de estrés (Teague y cols. 2007). Nuestros resultados también muestran que el consumo de 30% sacarosa durante 8 semanas disminuye los niveles de

corticosterona en suero, esto podría ser debido a los efectos metabólicos de la ingestión de sacarosa sobre la expresión de la CRH, como lo reportado previamente (Laugero y cols. 2002; Laugero y cols. 2004), donde el consumo de sacarosa estaría disminuyendo la expresión del mRNA de la CRH en el núcleo paraventricular (Ulrich-Lai y cols. 2007), por otro lado en el grupo S30/St el consumo de sacarosa atenúa la respuesta al estrés del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, donde el exceso de calorías contribuyen para amortiguar las respuestas de estrés fisiológico.

El estrés crónico no incrementa el peso de la glándula adrenal, a diferencia de lo observado en edad adulta (Ulrich-Lai y cols. 2007; Macedo y cols. 2012), previamente se ha sugerido una cierta adaptación a nivel celular que, estaría contribuyendo, a una adaptación ante la respuesta del estrés, sin embargo, esto aún no se ha esclarecido (Teague y cols. 2007). La dieta alta en sacarosa tampoco modifica el peso de la glándula adrenal, resultados similares a los observados en ratas adultas, con una ingesta rica en sacarosa (Díaz-Aguila y cols. 2016) o una dieta alta en grasa (Bruder-Nascimento y cols. 2013). En cuanto a la morfometría de la glándula adrenal, nuestros resultados mostraron, que el estrés favorece un proceso inflamatorio generalizado, así como a alteraciones de la glándula adrenal en función de la zona y la lateralidad. En la ZG observamos que el estrés crónico disminuyó el espesor en ambas glándulas, esto es similar a lo reportado previamente en ratas con hipoxia, donde la disminución del espesor en esta zona es debido a, una disminución o eliminación del contenido de gotas lipídicas, un marcado aumento en el número de liposomas o a la presencia de grandes mitocondrias (Lorente y cols. 2002), por otra parte también se ha observado que los efectos del estrés crónico en la ZG son generalmente opuestos a los efectos sobre las otras zonas (Lorente y cols. 2002; Wolman y cols. 1993). Esto podría estar relacionado y explicaría, los diferentes cambios observados en la densidad y el tamaño de las células, pero a diferencia de lo observado en ratas adultas (Koko y cols. 2004) y juveniles (Corona-Pérez y cols. 2015) estos cambios histológicos no incrementan la liberación de corticosterona. El alto consumo de sacarosa por 13 semanas reduce el espesor de la zona fasciculada sin modificar los niveles de corticosterona (Díaz-Aguila y cols. 2016), por otra parte, un alto consumo de sacarosa por 8 semanas no afecta el espesor de la ZF, pero si disminuye los niveles de corticosterona. Sin embargo, esta disminución puede ser debido a

alteraciones a nivel hipotalámico, como se mencionó anteriormente, donde el consumo de sacarosa representa un mecanismo endógeno para amortiguar la respuesta fisiológica aun en condiciones de estrés. Estos cambios diferentes en el espesor de las zonas podrían estar relacionados con modificaciones en la densidad de las células, el tamaño de las células y la presencia de sinusoides. Nuestros hallazgos muestran que la dieta alta en sacarosa no afecta la densidad celular (Díaz-Aguila y cols. 2016). Por su parte el estrés crónico produce hipertrofia o hiperplasia asociada con altos niveles de corticosterona (Ulrich-Lai y cols. 2006). En los animales estresados, la glándula adrenal es funcional y, si la estimulación de ACTH es suficiente para causar la hipertrofia (Harvey 2016). Por el contrario, la disminución de la densidad celular en el ZF podría estar asociado con bajos niveles de corticosterona y ACTH (Malendowicz y cols. 2000) o con hipotiroidismo (Sarwar y Janjua 2003). Es importante mencionar que la proliferación celular no se vio afectada la glándula adrenal por el estrés. La estimulación de la proliferación celular y la secreción de corticosterona se producen preferentemente después del tratamiento de ACTH (Miyamoto y cols. 1999). Tal vez es necesario tener unos altos niveles de ACTH para inducir la proliferación celular (Engeland y Levay-Young 1999, Miyamoto y cols. 1999). Por otro lado, la dieta alta en sacarosa tampoco afecto la proliferación celular, en ratas diabéticas se ha observado que la leptina puede estar participando en el mantenimiento de la proliferación celular a través del sistema simpaticoadrenal (Ergin y cols. 2007). El tejido adrenal representa un sistema de renovación celular en el que la remodelación estructural de adaptación se consigue mediante un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis (Leblond 1964). El área de los vasos sanguíneos de la ZR no se modificó. Sin embargo, el estrés crónico y la dieta alta en sacarosa afectan el área de los vasos sanguíneos en la médula adrenal izquierda, lo que podría causar hipoxia y la privación de nutrientes de la célula (Wietecha y cols. 2013). En situaciones de estrés se ha observado que la ACTH controla el desarrollo coordinado de la vasculatura mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; Vittet y cols. 2000; Thomas y cols. 2003), que es esencial para la angiogénesis y la permeabilidad vascular. Sin embargo, el estrés crónico podría cambiar las señales proangiogénicos causando insuficiencia de los vasos sanguíneos (Binet y Sapieha 2015), lo que podría causar hipoxia y la privación de nutrientes de la célula, mientras que la ingesta alta en sacarosa en ratas jóvenes estresadas disminuye los vasos

sanguíneos como resultado de la disminución de los niveles de corticosterona y ACTH (Pyter y cols. 2014), lo que sugiere una respuesta diferente para diferentes factores. El estrés crónico incrementa el número de células inmunes en ambas glándulas, sugiriendo un proceso inflamatorio. Además, de que se ha observado que cuando existe una inflamación aguda generalizada, incrementa la producción de citocinas pro-inflamatorias (Tian y cols. 2014), dichas citocinas regulan los niveles de corticosterona, la microarquitectura, la angiogénesis, y la esteroidogénesis en la glándula adrenal (Villar y cols. 2013; Franchimont y cols. 2000). Por el contrario, la falta de hormonas suprarrenales inhibe la función inmune innata (Yang y cols. 2011). En conclusión, la dieta y el estrés en la edad juvenil provocan una desorganización de la morfometría adrenal, disminuyendo el área de los vasos sanguíneos sin modificaciones en la proliferación celular, lo que sugiere que la exposición a estrés crónico así como una prolongada dieta alta en sacarosa puede contribuir a las enfermedades metabólicas en la vida adulta.

3er mes

Los resultados del tercer mes, muestran que el estrés crónico no disminuye la ganancia de peso corporal, resultados similares a los observados en estudios previos (Arcego y cols. 2014, de Oliveira y cols. 2014). Sin embargo, disminuye la ingesta de alimento y agua, esto puede ser debido al incremento de CRH y noradrenalina, las cuales poseen efectos anoréxicos que conllevan a la disminución de la ingesta (Dallman y cols. 2004; Bazhan y Zelena 2013), pero la disminución de la ingesta varía dependiendo del tipo, intensidad y duración del estrés (Foster y cols. 2006; Fachin y cols. 2008). Los animales con una alta ingesta de sacarosa disminuyen la ingesta de alimento sólido sin afectar la ganancia de peso corporal, respecto a esto se sabe que el exceso de calorías obtenidos por la ingesta de sacarosa, aumenta la acumulación de grasa visceral por lo cual no se observan cambios en la ganancia de peso corporal (Pérez-Torres y cols. 2009; Díaz-Aguila y cols. 2016). El estrés crónico no modifica la concentración de corticosterona como lo observado en estudios previos (Macedo y cols. 2012; Rostamkhani y cols. 2012). La dieta alta en sacarosa, tampoco modificó la concentración de corticosterona, resultados similares a los reportados previamente (Macedo y cols. 2012; Díaz-Aguila y cols. 2016). Las ratas estresadas sometidos a una dieta hipercalórica tampoco modificaron la concentración de corticosterona, de la misma manera que en los meses anteriores esto podría estar dado por el aumento de la ingesta

de comida palatable, la cual está mediando la respuesta al estrés (Pecoraro y cols. 2004; Adam y Epel 2007).

El estrés incrementa el peso de la glándula adrenal pero sin cambios en el nivel de corticosterona, previamente se ha demostrado que a pesar de la adaptación del eje Hipotálamo-Hipófisis-adrenal ante un estímulo de estrés, el peso de las glándulas adrenales se incrementa, lo cual a su vez puede indicar la demanda de la capacidad de las glándulas adrenales para secretar mayor cantidad de corticosterona (Zelena y cols. 2003). En ratas adultas, una ingesta rica en sacarosa (Díaz-Aguila y cols. 2016) o una dieta alta en grasa (Bruder-Nascimento y cols. 2013) no modifican el peso de la glándula adrenal ni los niveles de corticosterona. El aumento de peso adrenal también puede ser un signo de insuficiencia adrenal. En cuanto a la morfometría de la glándula adrenal, nuestros resultados mostraron que el estrés incrementa el espesor de la ZG, el cual puede estar relacionado con un incremento en los niveles de aldosterona como se observa en ratas hipertensas (Müller-Fielitz y cols. 2012), por otro lado, se sabe que el estrés aumenta la presión arterial a través del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal y el sistema simpático (Dong y cols. 2015), por lo que en ratas estresadas se observa aumento de la corticosterona plasmática y el contenido de noradrenalina en el tejido renal (Dong y cols. 2015), este incremento en los niveles de catecolaminas en situaciones de estrés podría explicar el incremento en el área de la medula observado en nuestro estudio. A diferencia de observado en meses anteriores el estrés no tiene ningún efecto sobre el espesor de la ZF y ZR. Por el contrario, el alto consumo de sacarosa por un período más largo reduce el espesor de la zona fasciculada, sin cambiar los niveles de corticosterona, resultados similares a los reportados previamente (Díaz-Aguila y cols. 2016). Por su parte, la disminución del espesor se ha relacionado con una reducción en el contenido de gotitas de lípidos intracelulares (Lorente y cols. 2002; Oliveira y cols. 2009). En condiciones de hiperglucemia, especialmente la diabetes tipo 2, la actividad del eje HPA y la producción hormonal de la corteza adrenal se ve afectada (Elahi-Moghaddam y cols. 2013). Esto puede conducir a la incidencia de la disfunción secundaria en la actividad de otras glándulas endocrinas y posteriormente, de exacerbación y de complicaciones de la enfermedad si no se logra el control de la glucosa en sangre (Barber y cols. 2003). El estrés crónico incrementó el número de células en la corteza. Sin embargo, este incremento está dado por un mayor porcentaje de células

pequeñas, es decir el estrés crónico produce hiperplasia en las zonas de la corteza adrenal, en humanos una mayor producción o estimulación crónica de aldosterona conlleva a una hiperplasia en la ZG (Seidel y Scholl 2016). Por el contrario, en la ZF, la hiperplasia celular no afecta la concentración de corticosterona, resultado similares a los observados previamente, donde se sugiere que la corticosterona no participa en el desarrollo del síndrome metabólico en edad adulta (Díaz-Aguila y cols. 2015), contrario, a lo observado en ratas juveniles, donde la hipertrofia causada por el estrés crónico (Díaz-Aguila, enviado) incrementa los niveles de corticosterona, y favorece el desarrollo de esteatosis hepática (Corona-Pérez y cols. 2015), esto es consistente con otros estudios donde la hipertrofia es la responsable de la liberación de corticosterona en respuesta a una señal de estrés (Gotohda y cols. 2005; Ulrich-Lai y cols. 2006). En la ZR también observamos un incremento en el número de células, pero igual que en las zonas antes mencionadas estas células son pequeñas por el estrés crónico, esto podría deberse a los bajos niveles de testosterona observados en este grupo (De León-Ramírez, tesis de Doctorado), dado que en estudios recientes muestran que la actividad adrenocortical es paralela a la actividad testicular, lo que indica una actividad funcional entre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (Ajdžanović y cols. 2015; Ajdžanović y cols. 2016). Finalmente, la hiperplasia en la medula adrenal podría deberse al incremento de noradrenalina observado en modelos con estrés (Dong y cols. 2015). Por el contrario, la dieta alta en sacarosa no modificó el número ni el porcentaje de células, esto sería por dos factores: el primero el organismo a través de la dieta echa andar ciertos mecanismo (PPAR- γ y VLDL) para poder responder adecuadamente al estrés (Ulrich-Lai y Ryan 2013; Xing y cols. 2012), para lo cual la glándula adrenal no tendría por qué verse afectada; y el segundo, los niveles altos de testosterona (De León-Ramírez, tesis de doctorado) estarían previniendo de algún modo la afección de la glándula, como lo reportado previamente (Ajdžanović y cols. 2015; Ajdžanović y cols. 2016). Es importante mencionar que la proliferación celular incrementada por el estrés, puede ser por un aumento de la secreción de aldosterona, ya que estudios previos reportan que la proliferación celular de la ZG aumenta en paralelo con el aumento de la secreción de aldosterona (McEwan y cols. 1996), también puede deberse a un incremento en los niveles de ACTH (Engeland y Levay-Young 1999, Miyamoto y cols. 1999), que si bien es cierto que no observamos niveles altos de

corticosterona no sabemos cómo se encuentran los niveles de ACTH. La dieta alta en sacarosa también incremento la proliferación celular, esto podría ser debido a un mecanismo de compensación debido a que el tejido adrenal representa un sistema de renovación celular en el que la remodelación estructural de adaptación se consigue mediante un equilibrio entre la proliferación celular y la apoptosis (Leblond 1964). Es posible que la disminución de la concentración de corticosterona en meses anteriores o el estrés oxidativo generado por la alta glucosa, sea lo que afecte la función fisiológica y la producción de esteroides en las células adrenales (Astort y cols. 2009). El área de los vasos sanguíneos de la ZR y médula derecha se vió afectada por el estrés y en la ZR y médula izquierda se afectó por el estrés y la dieta alta en sacarosa. Se observó una mezcla de vasos de gran calibre y vasos de pequeño calibre, se ha informado que la ACTH controla el desarrollo coordinado de la vasculatura mediada por el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF; Vittet y cols. 2000; Thomas y cols. 2003), que es esencial para la angiogénesis y la permeabilidad vascular. Sin embargo, el estrés crónico podría cambiar las señales proangiogénicos causando insuficiencia de los vasos sanguíneos (Binet y Sapieha 2015), lo que podría causar hipoxia y la privación de nutrientes de la célula. Cabe resaltar que en la médula del grupo estresado pudimos observar un incremento de eritrocitos dentro los vasos sanguíneos, este incremento está relacionado estrechamente con la presencia de estrés oxidativo en diferentes modelos celulares (D'Angelo y cols. 2001; D'Angelo y cols. 2005). Por otro lado, la dieta alta en sacarosa disminuye los vasos sanguíneos como resultado de la disminución de los niveles de corticosterona y ACTH (Pyter y cols. 2014), lo que sugiere una respuesta diferente para diferentes factores. Aunado a esto, también observamos que la glándula adrenal derecha del grupo S30, está rodeada de una capa de tejido conectivo más delgada, así como la presencia de células globosas en la zona reticular, lo que nos indica un proceso inflamatorio. Se ha reportado, que la inflamación y la presencia de colágeno es el comienzo de un proceso de fibrosis lo que podría alterar la secreción hormonal (Brown y cols. 1989) de esta manera la retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal se podría alterar y posteriormente provocar la muerte celular, por ello, la presencia de células pro y antiinflamatorias (Romero-Sarmiento y cols. 2012). Cabe mencionar que el número de células inmunes disminuyen en la médula izquierda del grupo estresado, esto puede ser debido a la disminución

del área de los vasos o al aumento de eritrocitos en esta zona. La dieta alta en sacarosa incrementa el número de células inmunes en la corteza y la medula, se sabe que el reclutamiento de células inmunes inicia cuando existe presencia de inflamación en la célula, para eliminar los agentes que causan la lesión (Robbins y Cotran 2007), aunado a esto, la leptina favorece la llegada de macrófagos, participando como un quimioatrayente en la célula, debido a que aumenta la síntesis de ciertas quimiocinas como la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1 por sus siglas en inglés), y vías de señalización necesarias para la migración de macrófagos como la de la cinasa aminoterminal c-Jun-1 (JAK-1 por sus siglas en inglés), la señal de activadores de transducción (STAT por sus siglas en inglés), las cinasas proteicas activadoras de la mitogénesis (MAPK por sus siglas en inglés) y la fosfatidilinositol 3-quinasa que regulan la activación de los macrófagos, ya que los macrófagos poseen receptores de leptina (Gruen y cols. 2007). En ratones *ob/ob*, la administración central de leptina acelera la infiltración de macrófagos renales a través de la melanocortina, sugiriendo que el sistema nervioso central, es capaz de controlar la inflamación periférica (Kim y cols. 2007; Tanaka y cols. 2010). Sin embargo, recientemente se ha observado que durante el desarrollo de la obesidad, el aumento de tejido adiposo en humanos y ratones activa vías de señalización como la activación del Factor de Necrosis Tumoral-alfa (FNT- α) y la Interleucina-6 (IL-6) para llevar a cabo el proceso de apoptosis, estas vías de señalización citotóxicas llevan a cabo la activación de caspasas proteínas relacionadas con la apoptosis del adipocito, incrementado de esta manera la apoptosis en el adipocito, lo que lleva a un aumento en la infiltración de macrófagos, provocando posteriormente resistencia a la insulina, esteatosis hepática y dislipidemias (Alkhour y cols. 2009). Estos resultados sugieren que el aumento de leptina observada por la dieta alta en sacarosa esté participando en la infiltración de células leucocitarias, a su vez este incremento de células estaría favoreciendo el desarreglo observado en la glándula adrenal junto con el inicio de inflamación. En conclusión los resultados muestran que el estrés y el consumo elevado de sacarosa provocan alteraciones histológicas en la glándula adrenal, mientras el tiempo de exposición al estrés, no fue suficiente para aumentar la concentración de corticosterona, aún con el consumo de sacarosa, esto indica que el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal no se afectó, por lo que se sugiere que la corticosterona no participa

en el desarrollo del síndrome metabólico. Sin embargo, ambos estímulos provocan que la asimetría adrenal sea más evidente.

9 CONCLUSIONES

El modelo de estrés por restricción:

- Al primer mes, el estrés induce atrofia celular, lo que estaría favoreciendo el aumento de la concentración de corticosterona, a su vez la producción de corticosterona se asocia al incremento en los vasos sanguíneos de la corteza y médula.
- Al segundo mes, el estrés no fue suficiente para provocar alguna alteración en la corteza, sin embargo si observamos una inflamación aguda generalizada, la cual ha sido asociado como el primer factor desencadenante de las alteraciones metabólicas.
- Al tercer mes, observamos un incremento en la proliferación celular en la corteza con una disminución en el área de los vasos sanguíneos de la ZR y médula.

Por otro lado, la dieta alta en sacarosa incrementa primero los indicadores metabólicos, posteriormente afecta la concentración de corticosterona y por ultimo modifica la arquitectura de la glándula adrenal:

- Al primer mes, incrementa el tejido adiposo y las concentraciones de leptina, sin observar modificaciones en la histología de la glandula adrenal.
- Al segundo mes, disminuye la concentración de corticosterona, posiblemente como consecuencia del incremento de leptina al primer mes, todo esto acompañado de un proceso inflamatorio, el también podría estar regulando la disminución de corticosterona.
- Por ultimo, al tercer mes, podemos observar cambios en la proliferación celular, el área de los vasos sanguíneos, observando presencia de colágeno en la glandula adrenal, como consecuencia del proceso inflamatorio y los bajos niveles de corticosterona abservados al segundo mes.

Finalmente, con la interaccion de ambos factores, la dieta parece mitigar los efectos por la respuesta al estrés.

10 PERSPECTIVAS

De acuerdo a los resultados, sería interesante evaluar si un estrés prolongado mantiene o favorece otros cambios histológicos en la glándula adrenal.

Otro dato interesante sería conocer la expresión de receptores de leptina y glucocorticoides en tejido adiposo y glándula adrenal, de esta manera podríamos concluir si la secreción de leptina, disminuye la concentración de corticosterona al segundo mes.

También sería interesante conocer si las alteraciones observadas en las otras zonas de la corteza y médula, modifican las concentraciones de las hormonas que secretan.

Del mismo modo, sería interesante conocer como otros factores (factores angiogenicos, células inmunes o citosinas), además de las hormonas, modifican la esteroidegenesis adrenal y la proliferación celular.

11 BIBLIOGRAFÍA

- Adam** TC, Epel ES. 2007. Stress, eating and the reward system. *Physiology and Behavior* 4:449-458.
- Ahima** RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell B, Maratos-Flier E, Flier JS. 1996. Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting. *Nature* 382:250-252.
- Ahrén** B, Havel PJ. 1999. Leptin increases circulating glucose, insulin and glucagon via sympathetic neural activation in fasted mice. *International Journal of Obesity and Related Metabolic Disorders* 6:660-665.
- Ainslie** DA, Proietto J, Fam CB, Thorburn WA. 2000. Short-term, high-fat diets lower circulating leptin concentrations in rats¹⁻³. *The American Journal of Clinical Nutrition* 71:438-442.
- Ajdžanović** V, Jarić I, Živanović J, Filipović B, Ristić N, Miler M, Milošević V. 2015. Testosterone application decreases the capacity for ACTH and corticosterone secretion in a rat model of the andropause. *Acta Histochemica* 6:528-535.
- Ajdžanović** VZ, Jarić IM, Živanović JB, Filipović BR, Šošić-Jurjević BT, Ristić NM, Stanković SD, Milošević VLj. 2016. Histological parameters of the adrenal cortex after testosterone application in a rat model of the andropause. *Histology and Histopathology* 11:1209-1220.
- Al-Harithy** RN. 2004. Relationship of leptin concentration to gender, body mass index and age in Saudi adults. *Saudi Medical Journal* 8:1086-1090.
- Altuna** ME, Lelli SM, San Martín de Viale LC, Damasco MC. 2006. Effect of stress on hepatic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity and its influence on carbohydrate metabolism. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 84:977-984.
- Ambrosius** WT, Compton JA, Bowsher RR, Pratt JH. 1998. Relation of race, age, and sex hormone differences to serum leptin concentrations in children and adolescents. *Hormone Research* 5:240-246.
- Arcego** DM, Krolow R, Lampert C, Noschang C, Ferreira AG, Scherer E, Wyse AT, Dalmaz C. 2014. Isolation during the prepubertal period associated with chronic access to palatable diets: effects on plasma lipid profile and liver oxidative stress. *Physiology & Behavior* 124:23-32.

- Arnaldi G**, Scandali VM, Trementino L, Cardinaletti M, Appolloni G, Boscaro M. 2010. Pathophysiology of dyslipidemia in Cushing's syndrome. *Neuroendocrinology* 1:86-90.
- Arvaniti K**, Deshaies Y, Richard D. 1998. Effect of leptin on energy balance does not require the presence of intact adrenals. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 275:105-111.
- Astort F**, Repetto EM, Martínez Calejman C, Cipelli JM, Sánchez R, Di Gruccio JM, Mercau M, Pignataro OP, Arias P, Cymeryng CB. 2009. High glucose-induced changes in steroid production in adrenal cells. *Diabetes Metabolism Research and Reviews* 5:477-486.
- Bassett JR**, West SH. 1997. Vascularization of the adrenal cortex: its possible involvement in the regulation of steroid hormone release. *Microscopy Research and Technique* 6:546-557.
- Barber M**, Kasturi BS, Austin ME, Patel KP, Mohankumar SM, Mohankumar PS. 2003. Diabetes-induced neuroendocrine changes in rats: role of brain monoamines, insulin and leptin. *Brain Research* 964:128–132.
- Baumgartner RN**, Ross RR, Waters DL, Brooks WM, Morley JE, Montoya GD, Garry PJ. 1999. Serum leptin in elderly people: associations with sex hormones, insulin, and adipose tissue volumes. *Obesity Research* 2:141-149.
- Bazhan N**, Zelena D. 2013. Food-intake regulation during stress by the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Brain Research Bulletin* 95:46–53.
- Berardelli R**, Karamouzis I, D'Angelo V, Zichi C, Fussotto B, Giordano R, Ghigo E, Arvat E. 2013. Role of mineralocorticoid receptors on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in humans. *Endocrine* 43:51-58.
- Binet F**, Sapiha P. 2015. ER Stress and Angiogenesis. *Cell Metabolism* 4:560-575.
- Bjørbaek C**, El-Haschimi K, Frantz JD, Flier JS. 1999. The role of SOCS-3 in leptin signaling and leptin resistance. *The Journal of Biological Chemistry* 274:30059-30065.
- Bornstein SR**, Uhlmann K, Haidan A, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA. 1997. Evidence for a novel peripheral action of leptin as a metabolic signal to the adrenal gland: leptin inhibits cortisol release directly. *Diabetes* 46:1235-1238.
- Bornstein SR**, Rutkowski H, Vrezas I. 2004. Cytokines and steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1-2:135-141.

Bray GA. 2013. Potential health risks from beverages containing fructose found in sugar or high-fructose corn syrup. *Diabetes Care* 1:11-12.

Brown FM, Zuckerman M, Longway S, Rabinowe SL. 1989. Adrenal medullary fibrosis in IDDM of long duration. *Diabetes Care* 12: 494-497.

Brousset Hernández-Jáuregui DM, Galindo MF, Valdez PRA, Romano PM, Schuneman AA. 2005. Cortisol en saliva, orina y heces: evaluación no invasiva en mamíferos silvestres. *Journal Veterinaria México* 3: 1-14.

Bruder-Nascimento T, Campos DH, Alves C, Thomaz S, Cicogna AC, Cordellini S. 2013. Effects of chronic stress and high-fat diet on metabolic and nutritional parameters in Wistar rats. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia* 57:642-649.

Brunner EJ, Hemingway H, Walker BR, Page M, Clarke P, Juneja M, Shipley MJ, Kumari M, Andrew R, Seckl JR, Papadopoulos A, Checkley S, Rumley A, Lowe GD, Stansfeld SA, Marmot MG. 2002. Adrenocortical, autonomic, and inflammatory causes of the metabolic syndrome: nested case-control study. *Circulation* 106:2659-2665.

Cao R, Brakenhielm E, Wahlestedt C, Thyberg J, Cao Y. 2001. Leptin induces vascular permeability and synergistically stimulates angiogenesis with FGF-2 and VEGF. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 98:6390-6395.

Carter DB, Lever JD. 1954. The zone intermedia of the adrenal cortex. A correlation of possible functional significance with development morphology and histochemistry. *Journal of Anatomic* 4:437-454.

Cervantes-Rodríguez M, Martínez-Gómez M, Cuevas E, Nicolás L, Castelán F, Nathanielsz PW, Zambrano E, RodríguezAntolín J. 2014. Sugared water consumption by adult offspring of mothers fed a protein-restricted diet during pregnancy results in increased offspring adiposity: the second hit effect. *British Journal of Nutrition* 111:616-624.

Charmandari E, Kino T, Souvatzoglou E, Chrousos GP. 2003. Pediatric stress: hormonal mediators and human development. *Hormone Research* 59:161-179.

Chen H, Charlat O, Tartaglia LA, Woolf EA, Weng X, Ellis SJ, Lakey ND, Culpepper J, Moore KJ, Breitbart RE, Duyk GM, Tepper RI, Morgenstern JP. 1996. Evidence that the

diabetes gene encodes the leptin receptor: identification of a mutation in the leptin receptor gene in db/db mice. *Cell* 3:491-495.

Cheng CY, Hornsby PJ. 1992. Expression of 11 beta-hydroxylase and 21-hydroxylase in long-term cultures of bovine adrenocortical cells requires extracellular matrix factors. *Endocrinology* 5:2883-2889.

Chennaoui M, Gomez Merino D, Lesage J, Drogou C, Guezennec CY. 2002. Effects of moderate and intensive training on the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in rats. *Acta Physiologica Scandinavica* 2:113-121.

Corona-Pérez A, Díaz-Muñoz M, Soto-Rodríguez I, Cuevas E, Martínez-Gómez M, Castelán F, Rodríguez-Antolín J, Nicolás-Toledo L. 2015. High sucrose intake ameliorates the accumulation of hepatic triacylglycerol promoted by restraint stress in young rats. *Lipids* 50:1103-1113.

Dallman MF, Akana SF, Strack AM, Scribner KS, Pecoraro N, La Fleur SE, Houshyar H, Gomez F. 2004. Chronic stress-induced effects of corticosterone on brain: direct and indirect. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1018:141-150.

D'Angelo S, Ingrosso D, Perfetto B, Baroni A, Zappia M, Lobianco LL, Tufano MA, Galletti P. 2001. UVA irradiation induces L-isoaspartyl formation in melanoma cell proteins. *Free Radical Biology & Medicine* 1:1-9.

D'Angelo S, Ingrosso D, Migliardi V, Sorrentino A, Donnarumma G, Baroni A, Masella L, Tufano MA, Zappia M, Galletti P. 2005. Hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil, prevents protein damage induced by long-wave ultraviolet radiation in melanoma cells. *Free Radical Biology & Medicine* 7:908-919.

De León-Ramirez YM. El efecto del consumo de sacarosa sobre el arreglo histológico, la conducta sexual y la fertilidad en la rata macho adulta. Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Tlaxcala.

de Oliveira C, Scarabelot VL, de Souza A, de Oliveira CM, Medeiros LF, de Macedo IC, Marques Filho PR, Cioato SG, Caumo W, Torres IL. 2014. Obesity and chronic stress are able to desynchronize the temporal pattern of serum levels of leptin and triglycerides. *Peptides* 51:46-53.

De Silva DC, Wijesiriwardene B. 2007. The adrenal glands and their functions. *The Ceylon Medical Journal* 52:95–100.

Díaz-Aguila Y, Castelán F, Cuevas E, Zambrano E, Martínez-Gómez M, Muñoz A, Rodríguez-Antolín J, Nicolás-Toledo L. 2016. Consumption of sucrose from infancy increases the visceral fat accumulation, concentration of triglycerides, insulin and leptin, and generates abnormalities in the adrenal gland. *Anatomical Science International* 91:151-162.

Donato JJr, Cravo RM, Frazão R, Elias CF. 2011. Hypothalamic sites of leptin action linking metabolism and reproduction. *Neuroendocrinology* 1:9-18.

Dong T, Chen JW, Tian LL, Wang LH, Jiang RD, Zhang Z, Xu JB, Zhao XD, Zhu W, Wang GQ, Sun WP, Zhang GX. 2015. Role of the renin-angiotensin system, renal sympathetic nerve system, and oxidative stress in chronic foot shock-induced hypertension in rats. *International Journal of Biological Science* 6:652-663.

Dorantes Cuellar A, Martínez Sibaja C, Guzmán Blanno A. 2012. Endocrinología clínica. Editorial *El Manual Moderno* 4ta edición 229-236.

Dunger DB, Ahmed ML, Ong KK. 2005. Effects of obesity on growth and puberty. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 3:375-390.

Elahi-Moghaddam Z, Behnam-Rassouli M, Mahdavi-Shahri N, Hajinejad-Boshroue R, Khajouee E. 2013. Comparative study on the effects of type 1 and type 2 diabetes on structural changes and hormonal output of the adrenal cortex in male Wistar rats. *Journal of Diabetes Metabolic and Disorders* 1:doi: 10.1186/2251-6581-12-9.

Elmqvist JK, Bjørbaek C, Ahima RS, Flier JS, Saper CB. 1998. Distributions of leptin receptor mRNA isoforms in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology* 4:535-547.

Engeland WC, Levay-Young BK. 1999. Changes in the glomerulosa cell phenotype during adrenal regeneration in rats. *American Journal of Physiology Regulatory and Integrative Company Physiology* 276: R1374–R1382

Epel ES, McEwen B, Seeman T, Matthews K, Castellazzo G, Brownell KD, Bell J, Ickovics JR. 2000. Stress and body shape: stress-induced cortisol secretion is consistently greater among women with central fat. *Psychosomatic Medicine* 5:623-632.

- Ergin K**, Aktuğ H, Başloğlu H, Başaloğlu HK, Yılmaz MI, Turgut M. 2007. The effect of leptin on adrenal glands in rats with streptozotocin-induced diabetes: an experimental study. *Analytical and Quantitative Cytology and Histology* 5:291-295.
- Fachin A**, Silva RK, Noschang CG, Pettenuzzo L, Bertinetti L, Billodre MN, Peres W, Busnello F, Dalmaz C. 2008. Stress effects on rats chronically receiving a highly palatable diet are sex-specific. *Appetite* 3:592-598.
- Fernández-Riejos P**, Najib S, Santos-Alvarez J, Martín-Romero C, Pérez-Pérez A, González-Yanes C, Sánchez-Margalet V. 2010. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators of Inflammation* doi:10.1155/2010/568343.
- Ferreira JG**, Cruz CD, Neves D, Pignatelli D. 2007. Increased extracellular signal regulated kinases phosphorylation in the adrenal gland in response to chronic ACTH treatment. *The Journal of Endocrinology* 3:647-658.
- Foster TM**, Solomon BM, Huhman LK, Bartness JT. 2005. Social defeat increases food intake, body mass, and adiposity in Syrian hamsters. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 290:R1284–R1293.
- Franchimont D**, Bouma G, Galon J, Wolkersdörfer GW, Haidan A, Chrousos GP, Bornstein SR. 2000. Adrenal cortical activation in murine colitis. *Gastroenterology* 6:1560-1568.
- Fuente-Martín E**, García-Cáceres C, Granado M, Sánchez-Garrido MA, Tena-Sempere M, Frago LM, Argente J, Chowen JA. 2012. Early postnatal overnutrition increases adipose tissue accrual in response to a sucrose-enriched diet. *The American Journal of Physiology Endocrinology Metabolic* 302:1586-1598.
- Furukawa S**, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M, Shimomura I. 2004. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The journal of Clinical Investigation* 114:1752-1761.
- Gannouni N**, Mhamdi A, El May M, Tebourbi O, Rhouma KB. 2014. Morphological changes of adrenal gland and heart tissue after varying duration of noise exposure in adult rat. *Noise Health* 73:416-421.

- Ge JF, Qi CC, Zhou JN.** 2013. Imbalance of leptin pathway and hypothalamus synaptic plasticity markers are associated with stress-induced depression in rats. *Behavioural Brain Research* 249:38–43.
- González-Hernández JA, Bornstein SR, Ehrhart-Bornstein M, Geschwend JE, Adler G, Scherbaum WA.** 1994. Macrophages within the human adrenal gland. *Cell and Tissue Research* 2:201-205.
- Goodson JM, Kantarci A, Hartman ML, Denis GV, Stephens D, Hasturk H, Yaskell T, Vargas J, Wang X, Cugini M, Barake R, Alsmadi O, Al-Mutawa S, Ariga J, Soparkar P, Behbehani J, Behbehani K, Welty F.** 2014. Metabolic disease risk in children by salivary biomarker analysis. *PLoS One* 9: 98799.
- Gotohda T, Tokunaga I, Kubo S.** 2005. Toluene inhalation-induced adrenocortical hypertrophy and endocrinological changes in rat. *Life Sciences* 17:1929-1937.
- Greep RO, Deane HW.** 1947. Cytochemical evidence for the cessation of hormone production in the zona glomerulosa of the rat's adrenal cortex after prolonged treatment with deoxycorticosterone acetate. *Endocrinology* 6:417–425.
- Gruen ML, Hao M, Piston DW, Hasty AH.** 2007. Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis. *American Journal of Physiology Cell Physiology* 293:1481-1488.
- Haffner SM, Miettinen H, Karhapää P, Mykkänen L, Laakso M.** 1997. Leptin concentrations, sex hormones, and cortisol in nondiabetic men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 6:1807-1809.
- Haque Z, Akbar N, Yasmin F, Haleem MA, Haleem DJ.** 2013. Inhibition of immobilization stress-induced anorexia, behavioral deficits, and plasma corticosterone secretion by injected leptin in rats. *Stress* 3:353-362.
- Harvey PW.** 2016. Adrenocortical endocrine disruption. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 155:199-206.
- Heiman ML, Ahima RS, Craft LS, Schoner B, Stephens TW, Flier JS.** 1997. Leptin inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in response to stress. *Endocrinology* 9:3859-3863.

- Hinson** JP, Vinson GP, Pudney J, Whitehouse BJ. 1989. Adrenal mast cells modulate vascular and secretory responses in the intact adrenal gland of the rat. *The Journal of Endocrinology* 2:253-260.
- Hui** XG, Akahira J, Suzuki T, Nio M, Nakamura Y, Suzuki H, Rainey WE, Sasano H. 2009. Development of the human adrenal zona reticularis: morphometric and immunohistochemical studies from birth to adolescence. *The Journal of Endocrinology* 2:241-252.
- Isasi** CR, Parrinello CM, Jung MM, Carnethon MR, Birnbaum-Weitzman O, Espinoza RA, Penedo FJ, Perreira KM, Schneiderman N, Sotres-Alvarez D, Van Horn L, Gallo LC. 2015. *Annals of Epidemiology* 2:84-89.
- Jennewein** C, Tran N, Kanczkowski W, Heerdegen L, Kantharajah A, Dröse S, Bornstein S, Scheller B, Zacharowski K. 2015. Mortality of Septic Mice Strongly Correlates With Adrenal Gland Inflammation. *Critical Care Medicine* [Epub ahead of print].
- Johnson** A, DiPietro LA. 2013. Apoptosis and angiogenesis; an evolving mechanism for fibrosis. *FASEB Journal* 10:3893–3901.
- Karbowska** J, Kochan Z. 2012. Leptin as a mediator between obesity and cardiac dysfunction. *Postepy Hig Med Dosw* 66:267-274.
- Kahn** R, Buse J, Ferrannini E, Stern M. 2005. The metabolic syndrome: Time for a critical appraisal. *Diabetologia* 48: 1684-1699.
- Kasai** T, Miyauchi K, Kubota N, Tamura H, Kojima T, Yokoyama K, Kurata T, Daida H. 2008. The relationship between the metabolic syndrome defined by various criteria and the extent of coronary artery disease. *Atherosclerosis* 197: 944-950.
- Khorram** NM, Magee TR, Wang C, Desai M, Ross M, Khorram O. 2011. Maternal undernutrition programs offspring adrenal expression of steroidogenic enzymes. *Reproductive Sciences* 10:931-940.
- Kim** JY, van de Wall E, Laplante M, Azzara A, Trujillo ME, Hofmann SM, Schraw T, Durand JL, Li H, Li G, Jelicks LA, Mehler MF, Hui DY, Deshaies Y, Shulman GI, Schwartz GJ, Scherer PE. 2007. Obesity-associated improvements in metabolic profile through expansion of adipose tissue. *The Journal of Clinical Investigation* 117:2621-2637.

- Kjölhede** EA, Gustafsson PE, Gustafsson PA, Nelson N. 2014. Overweight and obese children have lower cortisol levels than normal weight children. *Acta Paediatrica* 103:295-299.
- Koko** V, Djordjeviae J, Cvijiae G, Davidoviae V. 2004. Effect of acute heat stress on rat adrenal glands: a morphological and stereological study. *The Journal of Experimental Biology* 24:4225-4230.
- Koldzic-Zivanovic** N, Tu H, Juelich TL, Rady PL, Tyring SK, Hudnall SD, Smith EM, Hughes TK. 2006. Regulation of adrenal glucocorticoid synthesis by interleukin-10: a preponderance of IL-10 receptor in the adrenal zona fasciculata. *Brain, Behavior, and Immunity* 5:460-468.
- Konishi** N, Otaka M, Odashima M, Jin M, Wada I, Komatsu K, Sato T, Kato S, Matsushashi T, Watanabe S. 2006. Systemic stress increases serum leptin level. *Journal Gastroenterology and Hepatology* 21:1099-1102.
- Kraemer** FB, Khor VK, Shen WJ, Azhar S. 2013. Cholesterol ester droplets and steroidogenesis. *Molecular and cellular endocrinology* 2:15-19.
- Kraemer** FB, Shen WJ, Natu V, Patel S, Osuga J, Ishibashi S, Azhar S. 2002. Adrenal neutral cholesteryl ester hydrolase: identification, subcellular distribution, and sex differences. *Endocrinology* 3:801-806.
- Laugero** KD, Gomez F, Manalo S, Dallman MF. 2002. Corticosterone infused intracerebroventricularly inhibits energy storage and stimulates the hypothalamo-pituitary axis in adrenalectomized rats drinking sucrose. *Endocrinology* 12:4552-4562.
- Laugero** KD. 2004. Reinterpretation of basal glucocorticoid feedback: implications to behavioral and metabolic disease. *Vitamins and Hormones* 69:1-29.
- Leblond** CP. 1964. Classification of cell populations on the basis of their proliferative behavior. *National Cancer Institute Monograph* 14:119-150.
- Levin** BE, Richard D, Michel C, Servatius R. 2000. Differential stress responsivity in diet-induced obese and resistant rats. *American Journal of Physiology Regulatory Integrative Company Physiology* 279:1357-1364.

- Lissner** L, Karlsson C, Lindroos AK, Sjöström L, Carlsson B, Carlsson L, Bengtsson C. 1999. Birth weight, adulthood BMI, and subsequent weight gain in relation to leptin levels in Swedish women. *Obesity Research* 2:150-154.
- Long** JA. 1975. Zonation of the mammalian adrenal cortex. In Handbook of Physiology, Section 7 (*Endocrinology*), Vol 6. R.O. Greep & E.B. Astwood, Eds. 13–24. American Physiological Society. Washington, DC.
- Lorente** M, Mirapeix RM, Miguel M, Longmei W, Volk D, Cervós-Navarro J. 2002. Chronic hypoxia induced ultrastructural changes in the rat adrenal zona glomerulosa. *Histology and Histopathology* 1:185-190.
- Macedo** IC, Medeiros LF, Oliveira C, Oliveira CM, Rozisky JR, Scarabelot VL, Souza A, Silva FR, Santos VS, Cioato SG, Caumo W, Torres IL. 2012. Cafeteria diet-induced obesity plus chronic stress alter serum leptin levels. *Peptides* 38:189-196.
- Magennis** DP, McNicol AM. 1998. Vascular patterns in the normal and pathological human adrenal cortex. *Virchows Archives* 1:69-73.
- Malendowicz** LK, Tortorella C, Nowak KW, Nussdorfer GG, Hochól A, Majchrzak M. 2000. Leptin prolonged administration inhibits the growth and glucocorticoid secretion of rat adrenal cortex. *Endocrine Research* 2:141-152.
- Malendowicz** LK, Rucinski M, Belloni AS, Ziolkowska A, Nussdorfer GG. 2007. Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *International Review of Cytology* 263:63-102.
- Malik** VS, Popkin BM, Bray GA, Després JP, Willett WC, Hu FB. 2010. Sugar-sweetened beverages and risk of metabolic syndrome and type 2 diabetes: a meta-analysis. *Diabetes Care* 11:2477-2483.
- Marin** MT, Cruz FC, Planeta CS. 2007. Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior, corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology and Behaviors* 1:29-35.
- Marniemi** J, Kronholm E, Aunola S, Toikka T, Mattlar CE, Koskenvuo M, Rönnemaa T. 2002. Visceral fat and psychosocial stress in identical twins discordant for obesity. *Journal of International Medicine* 1:35-43.

- Martí O**, Martí J, Armario A. 1994. Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiology and Behaviors* 4:747-753.
- Martinez Calejman C**, Di Gruccio JM, Mercau ME, Repetto EM, Astort F, Sanchez R, Pandolfi M, Berg G, Schreier L, Arias P, Cymeryng CB. 2012. Insulin sensitization with a peroxisome proliferator-activated receptor γ agonist prevents adrenocortical lipid infiltration and secretory changes induced by a high-sucrose diet. *The Journal of Endocrinology* 3:267-276.
- McEwan PE**, Lindop GB, and Kenyon CJ. 1996. Control of cell proliferation in the rat adrenal gland in vivo by the renin-angiotensin system. *American Journal of Physiology and Endocrinology Metabolism* 271: E192–E198.
- McIlmoil S**, Call GB, Barney M, Strickland J, Judd AM. 2015. Interleukin-6 inhibits adrenal androgen release from bovine adrenal zona reticularis cells by inhibiting the expression of steroidogenic proteins. *Domestic Animal Endocrinology* 53:108-123.
- Meikle AW**, Kushnir MM, Rockwood AL, Pattison EG, Terry AH, Sandrock T, Bunker AM, Phanslkar AR, Owen WE, Roberts WL. 2007. Adrenal steroid concentrations in children seven to 17 years of age. *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism* 12:1281–1291.
- Michalakis K**, Goulis DG, Vazaiou A, Mintziori G, Polymeris A, Abrahamian-Michalakis A. 2013. Obesity in the ageing man. *Metabolism* 10:1341-1349.
- Miller WL**, Bose HS. 2011. Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *Journal of Lipid Research* 12:2111-2135.
- Milovanović T**, Budec M, Balint-Perić L, Koko V, Todorović V. 2003. Effects of acute administration of ethanol on the rat adrenal cortex. *Journal of Studies on Alcohol* 5:662-668.
- Mitani F**, Mukai K, Miyamoto H, Suematsu M, Ishimura Y. 2003. The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. *Biochimica et Biophysica Acta* 3:317-324.
- Mitani F**. 2014. Functional zonation of the rat adrenal cortex: the development and maintenance. *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences* 5:163-183.

- Miyamoto** H, Mitani F, Mukai K, Suematsu M, and Ishimura Y. 1999. Studies on cytochrome c in adult rat adrenal cortex: circadian and zonal variations and their modulation by adrenocorticotrophic hormone. *Journal of Biochemistry (Tokyo)* 126:1175–1183.
- Monti** V, Carlson JJ, Hunt SC, Adams TD. 2006. Relationship of ghrelin and leptin hormones with body mass index and waist circumference in a random sample of adults. *Journal of the American Dietetic Association* 6:822-828.
- Mouritsen** A, Johansen ML, Wohlfahrt-Veje C, Hagen CP, Tinggaard J, Mieritz MG, Tefre de Renzy-Martin K, Soeborg T, Fallentin E, Juul A, Main KM. 2014. Determination of adrenal volume by MRI in healthy children: associations to age, body size, pubertal stage and serum levels of adrenal androgens. *Clinical Endocrinology (Oxf)* 81:183–189.
- Müller-Fielitz** H, Lau M, Jöhren O, Stellmacher F, Schwaninger M, Raasch W. 2012. Blood pressure response to angiotensin II is enhanced in obese Zucker rats and is attributed to an aldosterone-dependent mechanism. *British Journal of Pharmacology* 8:2417-2429.
- Nader** N, Ng SS, Wang Y, Abel BS, Chrousos GP, Kino T. 2012. Liver x receptors regulate the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor: implications for the carbohydrate metabolism. *PLoS One* 3:10.
- Oates** M, Woodside B, Walker CD. 2000. Chronic leptin administration in developing rats reduces stress responsiveness partly through changes in maternal behavior. *Hormones and Behavior* 4:366-376.
- Oliveira** MJ, Monteiro MP, Ribeiro AM, Pignatelli D, Aguas AP. 2009. Chronic exposure of rats to occupational textile noise causes cytological changes in adrenal cortex. *Noise Health* 43:118-123.
- Ostlund** RE Jr, Yang JW, Klein S, Gingerich R. 1996. Relation between plasma leptin concentration and body fat, gender, diet, age, and metabolic covariates. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 11:3909-3913.
- Otis** M, Campbell S, Payet MD, Gallo-Payet N. 2007. Expression of extracellular matrix proteins and integrins in rat adrenal gland: importance for ACTH-associated functions. *The Journal of Endocrinology* 3:331-347.

- Papadopoulos V**, Miller WL. 2012. Role of mitochondria in steroidogenesis. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism* 6:771-790.
- Paul RF**, Hassan M, Nazar HS, Gillani S, Afzal N, Qayyum I. 2011. Effect of body mass index on serum leptin levels. *Journal of Ayub Medical College Abbottabad* 3:40-43.
- Pecoraro N**, Reyes F, Gomez F, Bhargava A, Dallman MF. 2004. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress. *Endocrinology* 8:3754-3762.
- Pecoraro N**, Gomez F, Dallman MF. 2005. Glucocorticoids dose-dependently remodel energy stores and amplify incentive relativity effects. *Psychoneuroendocrinology* 30:815–825.
- Pelleymounter MA**, Cullen MJ, Baker MB, Hecht R, Winters D, Boone T, Collins F. 1995. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. *Science* 5223:540-543.
- Pérez-Torres I**, Roque P, El Hafidi M, Diaz-Diaz E, Baños G. 2009. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender. *Free Radical Research* 8:761-771.
- Pervanidou P**, Chrousos GP 2012. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism* 61:611-619.
- Pinheiro CH**, Sousa Filho WM, Oliveira Neto Jd, Marinho Mde J, Motta Neto R, Smith MM, Silva CA. 2009. Exercise prevents cardiometabolic alterations induced by chronic use of glucocorticoids. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia* 4:400-408.
- Pintor C**, Loche S, Faedda A, Fanni V, Nurchi AM, Corda R. 1984. Adrenal androgens in obese boys before and after weight loss. *Hormone and Metabolic Research* 1540:544-548.
- Powell LM**, Nguyen BT. 2013. Fast-food and full-service restaurant consumption among children and adolescents: effect on energy, beverage, and nutrient intake. *Journal of the American Medical Association pediatrics* 167:14–20.
- Pralong FP**, Roduit R, Waeber G, Castillo E, Mosimann F, Thorens B, Gaillard RC. 1998. Leptin inhibits directly glucocorticoid secretion by normal human and rat adrenal gland. *Endocrinology* 139:4264-4268.

- Pyter** LM, Yang L, da Rocha JM, Engeland CG. 2014. The effects of social isolation on wound healing mechanisms in female mice. *Physiology and Behaviors* 127:64-70.
- Rappaport** M. 2001. Leptina: una hormona integradora. *IntraMed*.
- Rainey** WE. 1999. Adrenal zonation: clues from 11beta-hydroxylase and aldosterone synthase. *Molecular and Cellular Endocrinology* 1:151-160.
- Reinehr** T, Kulle A, Wolters B, Knop C, Lass N, Welzel M, Holterhus PM. 2014. Relationships between 24-hour urinary free cortisol concentrations and metabolic syndrome in obese children. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 99:2391-2399.
- Retana-Márquez** S, Bonilla-Jaime H, Vázquez-Palacios G, Domínguez-Salazar E, Martínez-García R, Velázquez-Moctezuma J. 2003. Body weight gain and diurnal differences of corticosterone changes in response to acute and chronic stress in rats. *Psychoneuroendocrinology* 28:207–227.
- Ricart-Jané** D, Rodríguez-Sureda V, Benavides A, Peinado-Onsurbe J, López-Tejero MD, Llobera M. 2002. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism* 51:925-931.
- Riccioni** G, D'Orazio N, Menna V, Lambo MS, Guagnano MT, Di Ilio C. 2003. Role of leptin in anorexia nervosa. *La Clinica Terapeutica* 6:401-404.
- Robbins**, Cotran. 2007. Patología estructural y funcional. *Elsiver* 7ma edición.43-77.
- Romero-Sarmiento** Y, Soto-Rodríguez I, Arzaba-Villalba A, García SH, Alexander-Aguilera A. 2012. Effects of conjugated linoleic acid on oxidative stress in rats with sucrose-induced non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of Functional Foods* 4:219–225.
- Rostamkhani** F, Zardooz H, Zahediasl S, Farrokhi B. 2012. Comparison of the effects of acute and chronic psychological stress on metabolic features in rats. *Journal of Zhejiang University. Science B* 11:904-912.
- Roubos** EW, Dahmen M, Kozicz T, Xu L. 2012. Leptin and the hypothalamo-pituitary-adrenal stress axis. *General and Comparative Endocrinology* 177:28-36.
- Ryan** AS, Berman DM, Nicklas BJ, Sinha M, Gingerich RL, Meneilly GS, Egan JM, Elahi D. 2003. Plasma adiponectin and leptin levels, body composition, and glucose utilization in adult women with wide ranges of age and obesity. *Diabetes Care* 8:2383-2388.

- Sanghez V**, Razzoli M, Carobbio S, Campbell M, McCallum J, Cero C, Ceresini G, Cabassi A, Govoni P, Franceschini P, de Santis V, Gurney A, Ninkovic I, Parmigiani S, Palanza P, Vidal-Puig A, Bartolomucci A. 2013. Psychosocial stress induces hyperphagia and exacerbates diet-induced insulin resistance and the manifestations of the Metabolic Syndrome. *Psychoneuroendocrinology* 12:2933-2942.
- Sarwar G**, Janjua MZ .2003. Effects of carbimazole on morphology of rat adrenals. *Journal of the College of Physicians and Surgeons-Pakistan: JCPSP* 2:94-97
- Seidel E**, Scholl UI. 2016. Intracellular Molecular Differences in Aldosterone- Compared to Cortisol-Secreting Adrenal Cortical Adenomas. *Frontiers in Endocrinology* 27:7:75.
- Seufert J**, Kieffer TJ, Habener JF. 1999. Leptin inhibits insulin gene transcription and reverses hyperinsulinemia in leptin-deficient ob/ob mice. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* 2:674-679.
- Shen WJ**, Patel S, Eriksson JE, Kraemer FB. 2010. Vimentin is a functional partner of hormone sensitive lipase and facilitates lipolysis. *Journal of Proteome Research* 4:1786-1794.
- Shen WJ**, Zaidi SK, Patel S, Cortez Y, Ueno M, Azhar R, Azhar S, Kraemer FB. 2012. Ablation of vimentin results in defective steroidogenesis. *Endocrinology* 7:3249-3257.
- Shen WJ**, Azhar S, Kraemer FB. 2016. Lipid droplets and steroidogenic cells. *Experimental Cells Research* 2:209-214.
- Silveira JA**, Colugnati FA, Poblacion AP, Taddei JA. 2000. The role of exclusive breastfeeding and sugar-sweetened beverage consumption on preschool children's weight gain. *Pediatric Obesity* 2:91-97.
- Slieker LJ**, Sloop KW, Surface PL, Kriauciunas A, LaQuier F, Manetta J, Bue-Valleskey J, Stephens TW. 1996. Regulation of expression of ob mRNA and protein by glucocorticoids and cAMP. *The Journal of biological chemistry* 10:5301-5304.
- Soldani P**, Gesi M, Lenzi P, Natale G, Fornai F, Pellegrini A, Ricciardi MP, Paparelli A. 1999. Long-term exposure to noise modifies rat adrenal cortex ultrastructure and corticosterone plasma levels. *Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology* 31:441-8.

- Stachowiak** A, Nussdorfer GG, Malendowicz LK. 1990. Proliferation and distribution of adrenocortical cells in the gland of ACTH- or dexamethasone-treated rats. *Histology and Histopathology* 1:25-29
- Stanhope** KL, Havel PJ. 2008. Endocrine and metabolic effects of consuming beverages sweetened with fructose, glucose, sucrose, or high-fructose corn syrup. *The American Journal of Clinical Nutrition* 6:1733S-1737S.
- Stephens** TW, Basinski M, Bristow PK, Bue-Valleskey JM, Burgett SG, Craft L, Hale J, Hoffmann J, Hsiung HM, Kriauciunas A. 1995. The role of neuropeptide Y in the antiobesity action of the obese gene product. *Nature* 6549:530-532.
- Stern** D, Smith LP, Zhang B, Gordon-Larsen P, Popkin BM. 2014. Changes in waist circumference relative to body mass index in Chinese adults, 1993-2009. *International Journal of Obesity (Lond)* 12:1503-1510.
- Stimson** RH, Walker BR. 2007. Glucocorticoids and 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in obesity and the metabolic syndrome. *Minerva Endocrinology* 32:141-159.
- Tamashiro** KL, Terrillion CE, Hyun J, Koenig JI, Moran TH. 2009. Prenatal stress or high-fat diet increases susceptibility to diet-induced obesity in rat offspring. *Diabetes* 58:1116-1125.
- Tanaka** M, Suganami T, Sugita S, Shimoda Y, Kasahara M, Aoe S, Takeya M, Takeda S, Kamei Y, Ogawa Y. 2010. Role of central leptin signaling in renal macrophage infiltration. *Endocrine Journal* 57:61-72.
- Teague** RC, Dhabhar SF, Barton HR, Beckwith-Hall B, Powell J, Cobain M, Singer B, McEwen SB, Lindon CJ, Nicholson KJ, Holmes E. 2007. Metabonomic Studies on the Physiological Effects of Acute and Chronic Psychological Stress in Sprague-Dawley Rats. *Journal of Proteome Research* 6:2080-2093.
- Testa** R, Basso A, Piantanelli L, Coppa G, Recchioni A, De Sio G, Testa I, Bonfigli AR, Di Paolo P. 1994. Blood catecholamine levels and lymphocyte beta-adrenoceptors following acute noise stress. *Bollettino della Societa Italiana di Biologica Sperimentale* 70:193-198.
- Thompson** MP. 1996. Meal-feeding specifically induces obese mRNA expression. *Biochemical and Biophysiological Research Communications* 2:332-337.

- Thomas M**, Keramidas M, Monchaux E, Feige JJ. 2003. Role of adrenocorticotrophic hormone in the development and maintenance of the adrenal cortical vasculature. *Microscopy Research and Technique* 61:247-251.
- Tian R**, Hou G, Li D, Yuan TF. 2014. A possible change process of inflammatory cytokines in the prolonged chronic stress and its ultimate implications for health. *ScientificWorldJournal* doi: 10.1155/2014/780616.
- Trevenzoli IH**, Valle MM, Machado FB, Garcia RM, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. 2007. Neonatal hyperleptinaemia programmes adrenal medullary function in adult rats: effects on cardiovascular parameters. *The Journal of Physiology* 2:629-637.
- Trevenzoli IH**, Pinheiro CR, Conceição EP, Oliveira E, Passos MC, Lisboa PC, Moura EG. 2010. Programming of rat adrenal medulla by neonatal hyperleptinemia: adrenal morphology, catecholamine secretion, and leptin signaling pathway. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 298:941-949.
- Triantafyllou GA**, Paschou SA, Mantzoros CS. 2016. Leptin and Hormones: Energy Homeostasis. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 3:633-645.
- Torres SJ**, Nowson CA. 2007. Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 12:887-894.
- Ulrich-Lai YM**, Figueiredo HF, Ostrander MM, Choi DC, Engeland WC, Herman JP. 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism* 291:965-973.
- Ulrich-Lai YM**, Ostrander MM, Thomas IM, Packard BA, Furay AR, Dolgas CM, Van Hooren DC, Figueiredo HF, Mueller NK, Choi DC, Herman JP. 2007. Daily limited access to sweetened drink attenuates hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis stress responses. *Endocrinology* 4:1823-1834.
- Ulrich-Lai YM**, Ryan KK. 2013. PPAR γ and stress: implications for aging. *Experimental Gerontology* 7:671-676.
- van Rossum FC**, Lamberts WJS. 2004. Polymorphisms in the Glucocorticoid Receptor Gene and Their Associations with Metabolic Parameters and Body Compositio. [Recent Progress in Hormone Research](#) 59:333-357.

- Vanaelst B**, De Vriendt T, Huybrechts I, Rinaldi S, De Henauw S. 2012. Epidemiological approaches to measure childhood stress. *Paediatric and Perinatal Epidemiology* 26:280-297.
- Vegiopoulos A**, Herzig S. 2007. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275:43–61.
- Velkoska E**, Cole TJ, Dean RG, Burrell LM, Morris MJ. 2008. Early undernutrition leads to long-lasting reductions in body weight and adiposity whereas increased intake increases cardiac fibrosis in male rats. *Journal of Nutrition* 138:1622–1627.
- Villar SR**, Ronco MT, Fernández Bussy R, Roggero E, Lepletier A, Manarin R, Savino W, Pérez AR, Bottasso O. 2013. Tumor necrosis factor- α regulates glucocorticoid synthesis in the adrenal glands of *Trypanosoma cruzi* acutely-infected mice. The role of TNF-R1. *PLoS One* 5:e63814.
- Vinson GP**, Hinson JP, Raven PW. 1985. The relationship between tissue preparation and function: Methods for the study of control of aldosterone secretion: A review. *Cell Biochem Funct.* 3: 235-253.
- Vittet D**, Ciais D, Keramidas M, De Fraipont F, Feige JJ. 2000. Paracrine control of the adult adrenal cortex vasculature by vascular endothelial growth factor. *Endocrine Research* 26:843-852.
- Walker CD**, Salzman C, Long H, Otis M, Roberge C, Gallo-Payet N. 2004. Direct inhibitory effects of leptin on the neonatal adrenal and potential consequences for brain glucocorticoid feedback. *Endocrine Research* 4:837-844.
- Wang J**, Milner R. 2006. Fibronectin promotes brain capillary endothelial cell survival and proliferation through $\alpha 5\beta 1$ and $\alpha v\beta 3$ integrins via MAP kinase signalling. *Journal of Neurochemistry* 1:148-159.
- Wietecha MS**, Cerny WL, DiPietro LA. 2013. Mechanisms of vessel regression: toward an understanding of the resolution of angiogenesis. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 367:3-32.
- Willenberg HS**, Ansurudeen I, Schebesta K, Haase M, Wess B, Schinner S, Raffel A, Schott M, Scherbaum WA. 2008. The endothelium secretes interleukin-6 (IL-6) and induces IL-6

and aldosterone generation by adrenocortical cells. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes* 1:S70-S74.

Wolkersdörfer GW, Bornstein SR. 1998. Tissue remodelling in the adrenal gland. *Biochemical of Pharmacology* 2:163-171.

Wolman M, Cervós-Navarro J, Sampaolo S, Cardesa A. 1993. Pathological changes in organs of rats chronically exposed to hypoxia. Development of pulmonary lipodosis. *Histology and Histopathology* 2:247-255.

Xia L, Dong Z, Zhang Y, Zhang X, Song X, Sun M, Hu Y, Liu S, Wang K, Qu X, Wei F. 2016. Interleukin-4 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mediates the upregulation of soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 in RAW264.7 cells—a process in which p38 mitogen-activated protein kinase signaling has an important role. *Journal of Microbiology, Immunology, and Infection* 3:344-351.

Xing Y, Lerario AM, Rainey W, Hammer GD. 2015. Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 2:243-274.

Xing Y, Rainey WE, Apolzan JW, Francone OL, Harris RB, Bollag WB. 2012. Adrenal cell aldosterone production is stimulated by very-low-density lipoprotein (VLDL). *Endocrinology* 2:721-731.

Yang C, Yan J, Wang HY, Zhou LL, Zhou JY, Wang ZG, Jiang JX. 2011. Effects of bilateral adrenalectomy on the innate immune responses following trauma in rats. *International journal of the care of the injured INJURY* 9:905-012.

Yates R, Katugampola H, Cavlan D, Cogger K, Meimaridou E, Hughes C, Metherell L, Guasti L, King P. 2013. Adrenocortical development, maintenance, and disease. *Current Topics in developmental Biology* 106:239-312.

Yau YH, Potenza MN. 2013. Stress and eating behaviors. *Minerva Endocrinologica* 3:255-267.

Zareian P, Karimi MV, Dorneyani G. 2011. The comparison of the effects of acute swimming stress on plasma corticosterone and leptin concentration in male and female rats. *Acta medica Iranica* 5:284-287.

Zelena D, Merg Z, Foldes A, Kovács JK, Tóth Z, Makara BG. 2003. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 285:E1110–E1117.

Zheng S, Qian W, Wang B, Shi X, Liang Z, Hu Z. 1997. [The stress reaction induced by intensive noise exposure in rats]. *Space Medicine and Medical Engineering (Beijing)* 5:333-336.

Zhou Y, Rui L. 2013. Leptin signaling and leptin resistance. *Frontiers of Medicine* 2:207-222.

12 ANEXOS

12.1 Anexo 1. Deshidratación de la glándula adrenal

1. Después de la disección, mantener el tejido en Bouin por 24 horas.
2. Sacar el tejido del Bouin y cortarlo a la mitad para deshidratar.
3. Realizar la deshidratación de acuerdo a la lista siguiente, cuidando de que la solución cubra ligeramente el tejido y mantener en agitación.

No de solución	Solución y concentración	Tiempo en minutos
1	Etanol 60%	15 min
2	Etanol 70%	20 min
3	Etanol 80%	20 min
4	Etanol 80%	30 min
5	Etanol 96%	30 min
6	Etanol 96%	30 min
7	Etanol 100%	30 min
8	Etanol 100%	30 min
9	Etanol 100%-Xileno	30 min
10	Xileno	30 min
11	Xileno	30 min

4. Posteriormente se colocan en paraplast X-tra (McCormick) por 45 min.
5. Se realiza otros dos cambios de paraplast X-tra (McCormick) el primero de 45 min y el segundo de 1hr 30 min.
6. Incluir los tejidos con paraplast limpio y dejar que solidifiquen.

NOTA: Previamente poner a licuar el paraplast en el horno a una temperatura máxima de 56 °C.

12.2 Anexo 2. Tinción de hematoxilina-eosina

Después de obtener los cortes en el micrótopo se dejan secar mínimo por 24 h, posteriormente se tiñen con los siguientes tiempos en las diferentes soluciones.

Pasos	No	Soluciones	Tiempo
Desparafinar	1	Xileno	5 min
	2	Xileno	5 min
	3	Etanol 100%-Xileno	5 min
Hidratación	4	Etanol 100%	5 min
	5	Etanol 100%	5 min
	6	Etanol 96%	3 min
	7	Etanol 80%	3 min
	8	Etanol 60%	3 min
	9	Agua destilada	3 min
Contraste	10	Hematoxilina de Harris	40 min
	11	Agua corriente	40 seg
	12	Etanol ácido	40 seg
	13	Agua destilada	40 seg
Azuleamiento	14	Etanol amoniacal	3 min
	15	Agua destilada	40 seg
	16	Eosina	3 min

	17	Agua destilada	40 seg
Deshidratación	18	Etanol 96%	40 seg
	19	Etanol 96%	40 seg
	20	Etanol 100%	30 seg
	21	Etanol 100%	30 seg
	22	Etanol 100%-Xileno	30 seg
	23	Xileno	30 seg
	24	Xileno	30 seg

Finalmente sin dejarlos expuestos al ambiente, los portaobjetos se montan con Cytoseal TM 60 y se dejan secar.

12.3 Anexo 3. Tinción Tricrómica de Masson

Después de obtener los cortes en el micrótopo se dejan secar mínimo por 24 h, posteriormente se tiñen con los siguientes tiempos en las diferentes soluciones.

Pasos	No	Soluciones	Tiempo
Desparafinar	1	Xileno	10 min
	2	Xileno-Etanol	5 min
	3	Etanol 100%	10 min
	4	Etanol 96%	3 min
	5	Etanol 80%	3 min
	6	Etanol 60%	3 min
	7	Agua destilada	3 min
Mordente	8	Fijador Bouin	12 hrs
	9	Agua corriente	20 min
	10	Hematoxilina de Weigert	11 min
	11	Agua corriente	40 seg
	12	Agua destilada	40 seg
Azuleamiento	13	Amoniaco al 1%	4 min
	14	Agua corriente	40 seg
	15	Biebrich Scarlet-Fushina Ácida	10 min
	16	Agua corriente	40 seg
Contraste	17	Acido. Fosfomolibdico-Ácido Fosfotungstico	4 min
	18	Azul de Anilina	5 min
	19	Ácido Acético Glacial al 1%	3 min

	20	Agua Corriente	40 seg
Deshidratación	21	Etanol 80%	40 seg
	22	Etanol 96%	30 seg
	23	Etanol 100%	1 min
	24	Etanol-Xileno	10 seg
	25	Xileno	20 seg

Finalmente sin dejarlos expuestos al ambiente, los portaobjetos se montan con Cytoseal TM 60 y se dejan secar.

12.4 Anexo 4. Tinción de Wright

Después de obtener los cortes en el micrótopo se dejan secar mínimo por 24 h, posteriormente se tiñen con los siguientes tiempos en las diferentes soluciones.

Pasos	No	Soluciones	Tiempo
Desparafinar	1	Xileno	5 min
	2	Xileno	5 min
	3	Etanol 100%-Xileno	5 min
Hidratación	4	Etanol 100%	5 min
	5	Etanol 100%	5 min
	6	Etanol 96%	3 min
	7	Etanol 80%	3 min
	8	Etanol 60%	3 min
	9	Agua destilada	3 min
Contraste	10	Colorante de Wrigth	5 min
	11	Agua corriente	5 min
Azuleamiento	12	Hematoxilina de Mayer	5 min
	13	Agua corriente	1 min
	18	Etanol 96%	40 seg
	19	Etanol 96%	40 seg
	20	Etanol 100%	30 seg

Deshidratación	21	Etanol 100%	30 seg
	22	Etanol 100%-Xileno	30 seg
	23	Xileno	30 seg
	24	Xileno	30 seg

Finalmente sin dejarlos expuestos al ambiente, los portaobjetos se montan con Cytoseal TM 60 y se dejan secar.

13. PUBLICACIONES



XXX Congreso Nacional de Bioquímica
Sociedad Mexicana de Bioquímica
Guadalajara, Jal. 2 al 8 de noviembre de 2014

<http://www.smb.org.mx/>

Sucrose consumption plus and chronic stress induces histological changes in the adrenal gland in the male rat

Yadira Díaz-Aguila, Francisco Castelán, Mauricio Díaz-Muñoz, Estela Cuevas, Margarita Martínez-Gómez, Jorge Rodríguez-Antolín and Leticia Nicolás-Toledo

Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala
Calle del Bosque S/N
Tlaxcala, Tlax. C.P 90000
Phone: (52) 246 46 52 700, ext. 1806
e-mail: lettita2@yahoo.com.

Recently, we have shown that consumption of 30% sucrose, weaning for three months, increases visceral adiposity and alters the histology of the adrenal gland, without changing the concentrations of serum corticosterone and leptin. In animal models it has been shown that stress combined with caloric diet, increases the weight of the adrenal gland, the alteration or the concentration of leptin and corticosterone. However, these results are dependent on the intensity, frequency and duration of stress and diet. We are now interested in evaluating the function of the adrenal gland in a situation of stress. The objective was to determine the effect of sucrose consumption more stress at weaning in the histological features of the adrenal gland, leptin and corticosterone. Thirty-two recently weaned (21 days age) Wistar male rats were divided in 4 experimental groups (8/group): control (C), stress more drinking water (St), 30% sucrose in drinking water (S30) and 30% sucrose in drinking water more stress (S30/St). Animals were subjected to a chronic stress during for 4 weeks. At sacrifice the adrenal gland was removed; both right and left adrenal glands were stained with Masson's trichrome to evaluate the histological organization and the presence of connective tissue of adrenal glands for each rat. The concentrations of leptin and corticosterone were measured using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (EIA) Kit. Statistical significance was determined by a two-way ANOVA followed by post hoc Newman-Keuls tests ($p < 0.05$). Stress increased corticosterone levels, the 30% sucrose in drinking water increased leptin levels, and the interaction increased the weight of the right adrenal gland. Stress, the 30% sucrose in drinking water and interaction modify the histological variables of the gland. Apparently, the sucrose consumption reverses damage caused by stress, by regulating the concentration of corticosterone, through leptin locally and through the axis hypothalamus-pituitary-adrenal. Finance: CONACYT a YDA (366801); PNPC C-122/2014, CONACYT-225126.





Consumo de sacarosa más estrés al destete afecta la glándula adrenal

Díaz-Aguila Yadira (Estudiante de posgrado)¹, Rodríguez-Antolín Jorge², Castelán Francisco², Atonal Juárez Kenia³, Díaz-Muñoz Mauricio⁴ y Nicolás-Toledo Leticia²

¹Doctorado en Ciencias Biológicas, UATx,

²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, UATx,

³Maestría en Ciencias Biológicas, UATx,

⁴Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-Juriquilla.

Resumen

Recientemente, hemos mostrado que el consumo de sacarosa al 30%, al destete durante tres meses, incrementa la adiposidad visceral y altera la histología de la glándula adrenal, sin modificar las concentraciones de corticosterona en suero. En modelos animales se ha mostrado, que el estrés combinado con dieta hipercalórica, incrementa el peso de la glándula adrenal, alterando o no la concentración de corticosterona, sin embargo, estos resultados son dependientes de la intensidad, frecuencia y duración del estrés y la dieta. Ahora estamos interesados en evaluar la función de la glándula adrenal ante una situación de estrés. El objetivo del trabajo fue determinar el efecto del consumo de sacarosa más el estrés al destete sobre las características histológicas de la glándula adrenal y la concentración de corticosterona. Para ello, utilizamos ratas macho Wistar de 21 días de edad (n=32). Las ratas fueron divididas en cuatro grupos (8/grupo) experimentales: ratas que consumen agua simple (C), agua simple+estrés (E), agua azucarada 30% (A30) y agua azucarada+estrés (A30+E). Los animales fueron sometidos a estrés crónico mediante inmovilización durante cuatro semanas. Al sacrificio se extrajo la glándula adrenal, fue fijada en Bouin, deshidratada en alcoholes ascendentes, aclarado en xilol e incluido en paraplast. Los cortes histológicos fueron teñidos con Tricrómica de Masson. La concentración de corticosterona se midió por el método de ELISA. Los resultados fueron analizados con ANOVA de dos vías y Newman Keuls como post-hoc. Encontramos, que el estrés incrementa los niveles de corticosterona contrario a lo sucedido en los animales A30, sin embargo, el peso de la glándula adrenal derecha se ve alterado con ambos estímulos; el estrés, la dieta y la interacción entre estos factores modifican las variables histológicas de la glándula. Al parecer el consumo de sacarosa revierte los daños ocasionados por el estrés. Financiamiento: CONACYT a YDA (366801); CONACYT INFR-2014-01-1010/188/2014; CONACYT C-122/2014-1010/1632014; CAYPI-UATX-2014.

35. El consumo elevado de sacarosa al destete induce cambios histológicos en la glándula adrenal sin afectar la concentración de corticosterona en la rata macho

Yadira Díaz Aguila¹, Francisco Castelán², Mauricio Díaz Muñoz³, Laura García-Rivera⁴, Estela Cuevas², Martínez-Gómez M^{2,4}, Jorge Rodríguez Antolín², Leticia Nicolás Toledo²
¹Dóctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala ²Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala ³Instituto de Neurobiología UNAM-Campus Juriquilla Querétaro ⁴Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México **Email:** yadrad19@gmail.com

Introducción: Los glucocorticoides, juegan un papel crítico en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. En pacientes obesos los niveles de glucocorticoides son normales e incluso bajos. En modelos animales adrenalectomizados, se revierte el efecto de las alteraciones metabólicas provocados por el consumo de dietas ricas en grasas-sacarosa, pero no se sabe, si las dietas ricas en azúcares tienen efecto sobre la concentración de corticosterona y la microarquitectura de la glándula adrenal.

Objetivos: Evaluar si el consumo elevado de sacarosa al destete afecta la organización histológica de la glándula adrenal y la concentración de corticosterona. **Material y Métodos:** Se utilizaron ratas machos de 21 días de edad, que conformaron a los grupos control (n=10) y experimental (n=10). Se les proporcionó agua con sacarosa al 30% desde el destete durante tres meses. Al sacrificio se colectó sangre y se extrajeron las glándulas adrenales. Se analizaron indicadores metabólicos y la concentración de corticosterona. Los datos fueron analizados aplicando una t-Student y una prueba de Chi-cuadrada.

Resultados: Los animales con la dieta rica en sacarosa mostraron: alteraciones en la microarquitectura de la glándula adrenal, sin afectar la concentración de corticosterona.

Conclusiones: El consumo elevado de sacarosa se correlaciona con una organización diferente de la glándula adrenal. Los presentes resultados sugieren que dicha reorganización histológica posiblemente sea la causa por la cual en humanos y en ratas no aumenta la concentración de corticosterona. **Financiamiento:** CONACYT a YDA (366801).



C - 180 Efecto del consumo de sacarosa a temprana edad sobre la concentración de corticosterona e histología de la glándula adrenal en la rata macho

Díaz-Aguila Y (1), Martínez-Gómez M (2), Díaz-Muñoz M (3), García-Rivera L (2), Castelán F (4), Rodríguez-Antolín J (4), Nicolás-Toledo L (4). (1) Doctorado en Ciencias Biológicas; Universidad Autónoma de Tlaxcala, (2) Instituto de Investigaciones Biomédicas; Universidad Nacional Autónoma de México, (3) Instituto de Neurobiología; Campus UNAM-Juriquilla, (4) Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.

Los glucocorticoides secretados por las glándulas adrenales, juegan un papel crítico en el metabolismo de carbohidratos y lípidos. Estos se han asociado con el desarrollo del síndrome metabólico. Sin embargo, en pacientes obesos y en ratas adultas con dieta alta en sacarosa, los niveles de glucocorticoides son normales e incluso bajos. En modelos animales adrenalectomizados, se revierte el efecto de las alteraciones metabólicas provocados por el consumo de dietas ricas en grasas-sacarosa, pero no se sabe, si las dietas ricas en azúcares pueden tener efecto sobre la concentración de corticosterona y el arreglo histológico de la glándula adrenal. Por ello, el objetivo es evaluar si el consumo elevado de sacarosa a temprana edad afecta la organización histológica de la glándula adrenal y la concentración de corticosterona. Metodología: Se utilizaron ratas machos Wistar de 21 días de edad, que conformaron 6 grupos experimentales. Se les proporcionó agua con sacarosa al 30% durante un, dos y tres meses. Se registró el peso corporal, consumo de alimento y agua. Al sacrificio se extrajo la glándula adrenal y fue pesada. La glándula adrenal fue fijada en Bouin y deshidratada en alcoholes de manera ascendente, aclarada en xilol e incluida en Paraplast. Los cortes histológicos de 7µm fueron teñidos con Hematoxilina-Eosina. Se midió la concentración de corticosterona sérica. Cada dato obtenido fue analizado con su respectiva prueba estadística. Resultados: El análisis histológico de la glándula adrenal mostró modificaciones en el tamaño de las células de la zona fascicular, y ello se asoció con la disminución en la concentración sérica de corticosterona. También observamos una organización histológica diferente en la zona fascicular de la glándula adrenal izquierda a los tres meses por el consumo de agua azucarada. Conclusiones: El consumo elevado de sacarosa se correlaciona con una organización diferente de la glándula adrenal. Los presentes resultados sugieren que dicha reorganización histológica posiblemente sea la causa por la cual en humanos y en ratas no aumenta la concentración de corticosterona.

Agradecimientos:

Financiamiento: CONACYT a DAY (366801).





XL REUNIÓN ANUAL

Academia de Investigación
en Biología
de la Reproducción, A.C.

Del 20 al 23 de Mayo
de 2015 Hotel Emporio,
Ixtapa, Guerrero.

El consumo elevado de sacarosa modifica el arreglo histológico gonadal y los niveles séricos de leptina y testosterona en ratas infantiles.

De León Ramírez Yeimy Mar¹, Morimoto S², Corona-Pérez A³, Díaz-Aguilar Y³,
Martínez-Gómez M^{4,5}, Rodríguez-Antolín J⁴, Nicolás L⁴.

¹ *Maestría en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.*

² *Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Zubirán", México DF, México.*

³ *Doctorado en Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Tlaxcala.*

⁴ *Centro Tlaxcala de Biología de la Conducta, Universidad Autónoma de Tlaxcala.*

⁵ *Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México.*

En humanos, con sobrepeso y/o obesidad, se ha reportado una disminución de la libido y disfunción eréctil, así como infertilidad y baja concentración de testosterona. Por otro lado, la deficiencia en la producción de andrógenos testicular está relacionada con la cantidad de grasa corporal y los niveles de leptina. En modelos animales, se ha mostrado que una dieta alta en grasa en edad adulta, incrementa las concentraciones de leptina y disminuye la testosterona, promoviendo diferencias histológicas en túbulos seminíferos, afectando la fertilidad, además los niveles de FSH y LH aumentan cuando las ratas reciben 10 y 30 µg/kg de leptina e induce estrés oxidativo y anomalías anatómicas en el espermatozoide. Sin embargo, no está claro el papel de la leptina en la reproducción, además, no hay trabajos donde se evalué el efecto de una dieta alta en carbohidratos sobre la concentración de testosterona y el arreglo histológico del testículo en ratas jóvenes. Metodología: Ratas machos Wistar de 21 días de edad (n=16) fueron divididas en dos grupos experimentales: ratas que consumieron agua simple (C) y ratas que consumieron agua azucarada al 30% (S30) durante un mes. Al final del periodo experimental, se midió la glucosa. Inmediatamente las ratas fueron sacrificadas por decapitación. Se extrajo y pesaron los testículos y el tejido adiposo total. El testículo derecho fue fijado en Bouin, deshidratado en alcoholes ascendentes, aclarado en xilol e incluido en paraplast. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Los niveles de leptina y testosterona se midieron por el método de ELISA. Los datos fueron analizados mediante la prueba Student-t. Resultados preliminares: Las ratas que consumieron agua azucarada muestran aumento en los niveles de leptina y en el peso testicular, acompañado de modificaciones histológicas en el citoplasma, epitelio germinativo y lumen. Por otro lado, los datos indican una tendencia en aumentar los niveles de testosterona. Conclusiones: El presente estudio muestra que el consumo de una dieta rica en sacarosa, modifica el arreglo histológico gonadal y posiblemente aumenta los niveles de testosterona durante la infancia a diferencia de lo que se ha reportado en edad adulta y con dieta alta en grasa.

Financiamiento: CONACYT a YMDLR (631998)