

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**Papel de la citocina IL-6 en la regulación del peso corporal en ratones de
la cepa BALB/c bajo condiciones de estrés crónico**

POR:

BIÓL. ENRIQUE VÁZQUEZ CRUZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN INMUNOBIOLOGÍA

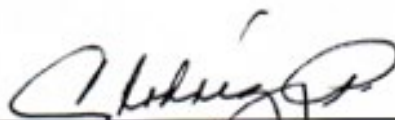
Abril, 2021

Papel de la citocina IL-6 en la regulación del peso corporal en ratones de la cepa BALB/c bajo condiciones de estrés crónico

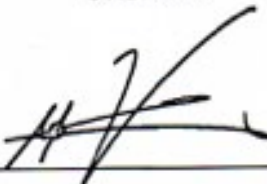
Comité de tesis

DIANA
CASABLANCA

Dra. Diana Caballero Hernández
Director de tesis



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



Dr. José Alberto Valadez Lira
Vocal



Dr. Ricardo A. Gómez Flores
Vocal



Dra. Patricia Tamez Guerra
Vocal

Papel de la citocina IL-6 en la regulación del peso corporal en ratones de la cepa BALB/c bajo condiciones de estrés crónico

Dirección de tesis

DIANA
CABALLERO

Dra. Diana Caballero Hernández
Director



Dr. Alberto Camacho Morales
Director externo

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por brindarme el apoyo económico que me permitió cumplir con mis estudios de maestría.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y a la Doctora Cristina Rodríguez Padilla por el apoyo económico e infraestructura brindadas durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Diana Caballero por haberme dado la oportunidad y por todo el tiempo que ha dedicado para poder terminar este proyecto. Agradezco la paciencia que me ha tenido y el apoyo que me ha dado a lo largo de los últimos años.

A mis compañeros y amigos de laboratorio por su ayuda y compañía: Isaías Gutiérrez, Ana Cantú, y Jerónimo Pérez.

Gracias a mis compañeros de maestría, Juan, Pedro, Pao, Alejandra y Ana por su amistad y compañía.

A Marcela Betancourt por su apoyo incondicional, por aguantarme y por escucharme siempre que lo necesite.

A mis padres, Trinidad Cruz Bañuelos y Enrique Vázquez Juárez

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	vi
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Regulación del peso corporal	3
Estrés psicogénico (generalidades y efectos sobre metabolismo)	7
Interleucina 6	11
IL-6 y regulación del peso corporal	12
JUSTIFICACIÓN	15
HIPÓTESIS	16
OBJETIVOS	17
OBJETIVO GENERAL	17
OBJETIVOS ESPECIFICOS	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
Animales	18
Diseño experimental y protocolo de estrés crónico	18
Administración del bloqueador adrenérgico propranolol	19
Administración de IL-6 recombinante murina	19
Prueba posprandial (metabolismo de la glucosa)	20
Monitoreo del peso corporal y cálculo del índice de masa corporal	20
Monitoreo de ingesta de alimento	20
Obtención de muestras	20
Cuantificación de la grasa corporal	21
Cuantificación de los niveles plasmáticos de IL-6	21
Análisis estadístico	22
RESULTADOS	23
1. Efecto del estrés crónico sobre indicadores morfométricos, de composición corporal y metabólicos	23

2. Evaluar la participación del sistema nervioso simpático en alteraciones metabólicas y de composición corporal por estrés crónico en hembras BALB/c	27
3. Efecto de la administración IL-6 recombinante en las alteraciones metabólicas y de composición corporal inducidas por estrés crónico en ratones BALB/c hembras	30
4. Citocinas plasmáticas	32
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES	39
BIBLIOGRAFÍA	40
RESUMEN BIOGRÁFICO	53
ANEXO I	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales antecedentes referentes al efecto de la IL-6 en la regulación del peso corporal.....	14
Tabla 2. Calendarización del protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento..	19

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Control de la ingesta de alimentos por el núcleo arqueado del hipotálamo.....	6
Figura 2. Sistema Nervioso Simpático.....	9
Figura 3. Eje hipotalámico pituitario adrenal.....	9
Figura 4. Efecto del estrés crónico sobre el peso corporal e IMC en ratones BALB/c de ambos sexos.	24
Figura 5. El estrés crónico no influye en la ingesta de alimento de ratones BALB/c de ambos sexos.....	24
Figura 6. El estrés disminuye la grasa corporal en hembras BALB/c bajo estrés crónico....	26
Figura 7. El estrés disminuye los depósitos de grasa interescapular de ratones BALB/c bajo estrés crónico.....	26
Figura 8. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones BALB/c bajo estrés crónico.....	27
Figura 9. Efecto del propanolol sobre el peso corporal e IMC en ratones hembra BALB/c.....	28
Figura 10. Efecto del propanolol sobre la grasa corporal y la tolerancia a la glucosa en ratones hembra BALB/c bajo condiciones de estrés crónico	29
Figura 11. Efecto de la administración de IL-6 sobre el peso corporal e IMC bajo condiciones de estrés crónico en ratones hembra.....	30
Figura 12. Efecto de la administración de IL-6 sobre el peso corporal e IMC bajo condiciones de estrés crónico en ratones hembra.....	31
Figura 13. Niveles plasmáticos de citocinas en ratones BALB/c bajo condiciones de reposo y estrés crónico y dos tratamientos.....	33

SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
µg	Microgramo
µL	Microlitro
ACTH	Adrenocorticotropina
AgRP	Proteína relacionada con agouti
ARC	Núcleo arcuato
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
CRF	Factor liberador de catecolaminas
CRH	Hormona liberadora de corticotropina
dL	Decilitro
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
g	Gramo
HPA	Hipotalámico-pituitario-adrenal
i.c.v.	Intracerebroventricular
i.p.	Intraperitoneal
IFN-γ	Interferon gamma
IL-10	Interleucina 10
IL-17A	Interleucina 17A
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina-6
IMC	Índice de masa corporal
kg	Kilogramo
MC3/4R	Receptores de melanocortina 3 y 4
MCH	Hormona concentradora de melanina
mg	Miligramo
min	Minuto

mL	Militro
mm	Milímetro
ng	Nanogramo
NPY	Neuropéptido Y
pg	Picogramo
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo paraventricular
SAM	Simpático-adrenal-medular
SNS	Sistema nervioso simpático
STAT 3	Transductor de señal y activador de la transcripción 3
TNF	Factor de necrosis tumoral
TRH	Hormona liberadora de tiotropina
α	Alfa
α -MSH	Hormona estimuladora de melanocitos
β	Beta

RESUMEN

La homeóstasis energética es necesaria para que los individuos sean capaces de mantener un peso estable y se ha demostrado la participación del sistema inmune en este proceso, específicamente macrófagos y citocinas como la IL-6. Dado que los niveles de la citocina IL-6 se incrementan en respuesta al estrés, y que el estrés también afecta el peso corporal, en este trabajo nos propusimos determinar si la elevación de la IL-6 en respuesta al estrés es necesaria para que las hembras BALB/c, carentes de esta respuesta al estrés, mantengan su peso corporal. Ratones BALB/c de 12 semanas, de ambos sexos, se sometieron a un protocolo de estrés crónico por restricción del movimiento. Dos grupos adicionales de hembras se trataron con un antagonista adrenérgico para receptores tipo β 1-2 (propranolol), o IL-6 recombinante diariamente. En ratones sometidos a estrés crónico, se observó disminución de su peso corporal en el periodo de tiempo del día 0 al 8, para ambos sexos y, al día 8 del protocolo, se observó ganancia de peso sin lograr recuperar su peso corporal inicial. El IMC de las hembras sometidas a estrés disminuyó significativamente, situación no observada en los ratones macho. No se encontró cambios en la conducta alimentaria de los ratones. La prueba posprandial en los ratones hembra bajo condiciones de estrés se observaron niveles de glucosa menores a los esperados, aunque recuperó su estado basal después de las dos horas y se encontró una disminución en sus depósitos de grasa interescapular, inguinal y visceral, casos no observados en los ratones macho. Esto sugiere que existen alteraciones en la capacidad de absorción de glucosa en las hembras sometidas a estrés, lo que podría estar relacionado con un déficit energético que se compensa con gasto del tejido graso. Los tratamientos con propranolol y con IL-6 fueron capaces de normalizar la absorción de glucosa y proteger los depósitos de grasa, mostrando la importancia del SNS y de la IL-6 en la regulación de estos parámetros. Al evaluar los niveles de citocinas bajo distintas condiciones se encontró que los machos, al ser sometidos a estrés crónico, presentaban una elevación en sus niveles plasmáticos de IL-6, mientras que las hembras no mostraban esta citocina. Estos resultados muestran la importancia de la IL-6 en la regulación del metabolismo bajo condiciones de estrés crónico.

ABSTRACT

Energy homeostasis is necessary for individuals to be able to maintain a stable weight, and the participation of the immune system in this process has been demonstrated, specifically macrophages and cytokines such as IL-6. Given that plasmatic levels of IL-6 increase in response to stress, and that stress also affects body weight, the aim of this work was to determine if the surge of IL-6 in response to stress it is necessary for BALB/c female mice that lack this stress response, to maintain their body weight. Twelve weeks old BALB/c mice of both sexes were subjected to a chronic stress protocol of movement restriction. Two additional groups of females were treated with propranolol (a beta 1 and 2 adrenergic receptor antagonist,), or rIL-6 daily. In mice subjected to chronic stress, a decrease in body weight was observed between day 0 and 8, for both sexes and, on day 8 of the protocol, weight gain was observed without regaining its initial body weight. The BMI of females subjected to stress decreased significantly, a situation not observed in male mice. No changes were found in the food intake of the mice. The postprandial test in female mice under stress conditions showed lower glucose levels, although they recovered to basal state after two hours. A decrease in their interscapular, inguinal and visceral fat deposits of female mice, but not male, was found. This finding suggests alterations in the glucose absorption capacity of females under stress, this could result in an energy deficit that is compensated by the expenditure of fat tissue. Blocking beta 1,2 adrenergic signaling with propranolol and the i.p. infusion of IL-6 were able to normalize glucose absorption and protect fat deposits, showing the importance of SNS and IL-6 in regulating these parameters. When evaluating the levels of cytokines under different conditions, it was found that the males under chronic stress presented an elevation in their plasma levels of IL-6, while in the females this cytokine was not detectable. These results support a role for IL-6 in the regulation of metabolism under conditions of chronic stress.

INTRODUCCIÓN

La regulación del peso corporal en los seres vivos a lo largo del tiempo se ha entendido como el producto de la homeostasis energética, es decir, que la ingesta y el gasto energético están equilibrados. Sin embargo, la actividad de los seres vivos es diversa y dependiente de la etapa de vida y de los ritmos biológicos que determinan la vigilia y el sueño, por lo que la actividad de un individuo presenta desequilibrios constantes y adaptaciones al entorno. De manera notable, se ha demostrado que a pesar de estos desequilibrios, el peso de los seres vivos suele mantenerse dentro de un rango estable, que llegan a afectarse en condiciones de cambios significativos en la ingesta o en el gasto energético.

Un modelo importante capaz de romper la homeostasis energética es el estrés. El estrés es una amenaza consciente e inconsciente percibida por el sistema nervioso central y periférico, con la capacidad de alterar la homeostasis de los organismos, temporalmente, al producirse una respuesta fisiológica hacia el estresor. A nivel fisiológico, el estrés actúa y altera la homeostasis de los organismos principalmente a través de la activación del eje hipotalámico-pituitario-adrenal (HPA), con la secreción de glucocorticoides, y en forma alterna activando al sistema adrenérgico con la producción de las catecolaminas epinefrina y norepinefrina, el objetivo primario de ambos cambios es el de liberar energía de los almacenes corporales para hacer frente a las amenazas, reales o percibidas. Además de los glucocorticoides y las catecolaminas, hoy en día sabemos que elementos del sistema inmune como la IL-6 también participan en esta homeostasis energética, aunque aún no se conoce su contribución precisa en esta regulación debido a que los estudios en el tema son contradictorios.

De acuerdo con datos obtenidos en nuestro laboratorio, la cepa de ratones BALB/c responden de forma dependiente del sexo al estrés crónico. En un experimento de estrés crónico por restricción de movimiento se observó que en los ratones hembra, en contraste con los machos, los niveles de IL-6 en el plasma no aumentaban en respuesta al estrés crónico y correlacionaban con la pérdida de peso corporal. Se sabe que la IL-6 está involucrada en la respuesta al estrés y en la regulación del peso corporal, pero los estudios disponibles son

contradictorios, por lo que en este trabajo nos proponemos explorar el papel de la IL-6 en la respuesta al estrés crónico en la cepa de ratones BALB/c.

ANTECEDENTES

Regulación del peso corporal

Todos los organismos vivos necesitan energía para realizar sus funciones vitales, por lo que requieren un suministro continuo de la misma a través de la ingesta selectiva de alimentos (De Luis et al., 2006). Para mantener un peso constante, tiene que existir un equilibrio de energía, en donde el consumo de energía tiene que ser igual al gasto de energía. Si el balance de energía se ve perturbado por algún factor externo o interno al cuerpo, eventualmente se presentarán problemas de ganancia positiva de energía y peso como la obesidad. Este proceso es conocido como homeostasis energética. Estados de balance energético negativo, como ocurre durante el ayuno, dietas de restricción de alimentos o enfermedades, inducen alteraciones neuroendocrinas caracterizadas por una disminución en el gasto energético, permitiendo al organismo adaptar el gasto metabólico y realizar sus necesidades metabólicas esenciales (Klok et al., 2007).

Entre los diferentes niveles de regulación de la homeostasis de energía, la región cerebral del hipotálamo ejerce una función importante en la alimentación y gasto energético, por lo que es una de las partes más estudiadas en esta área. Particularmente, el es una región anatómica del diencefalo, localizada entre el tercer ventrículo y la lámina terminal (límite interno), tálamo (límite superior) y globo pálido, cápsula interna, región subtalámica y pedúnculos cerebrales (límite posterior y lateral), y está compuesto de diferentes núcleos, que incluyen al núcleo arcuato (ARC), paraventricular, supraóptico, preóptico, entre otros. El ARC es de vital importancia en la regulación del metabolismo y homeostasis de energía (Myers & Olson, 2012). Este se encuentra ubicado cerca de la eminencia media, un órgano circunventricular altamente vascularizado que carece de barrera hematoencefálica, lo que facilita el transporte de señales periféricas hormonales y de nutrientes, y su detección por el ARC. De este modo, el ARC integra señales metabólicas hormonales y nutricionales de la circulación periférica, así como aferentes neuronales periféricas y centrales para generar una respuesta coordinada a las necesidades energéticas (Rodríguez et al., 2010).

Se conoce que, a nivel del hipotálamo, el peso corporal está regulado por neuropéptidos hipotalámicos que promueven o inhiben el balance energético mediante cambios en la ingesta de alimentos y el gasto energético.

Existen dos tipos de neuronas en el ARC, las neuronas orexigénicas (estimulan el apetito) como la AgRP/NPY que expresa el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada con agouti (AgRP), y las neuronas anorexigénicas (inhiben el apetito) como POMC que expresan proopiomelanocortina (POMC) (fig. 4; Balthasar et al. 2005; Gropp et al. 2005). Los neuropéptidos NPY, AgRP, la hormona concentradora de melanina (MCH) y las orexinas tienen fuertes efectos orexigénicos y anabólicos (Vianna & Coppari, 2011). El ayuno induce la activación de las neuronas AgRP/NPY que proyectan en varios sitios hipotalámicos que están implicados en la regulación del comportamiento de alimentación, en particular el PVN (Betley et al., 2013). El NPY estimula directamente la ingesta de alimento mediante la activación de los receptores NPY Y1 y Y5. Además, el NPY reduce el gasto de energía a través de la activación del receptor Y1 y el decremento de la expresión de la tirosina hidroxilasa en el PVN y el tronco cerebral, lo que conduce a una disminución del rendimiento simpático al tejido adiposo pardo, reduciendo su actividad. La AgRP actúa como un antagonista de los receptores de melanocortina 3 y 4 (MC3/4R), evitando así el efecto anorexigénico de la hormona estimuladora de melanocitos (α -MSH) sobre neuronas de segundo orden y promoviendo indirectamente la ingesta de alimento. A su vez, las neuronas AgRP/NPY pueden inhibir directamente a las neuronas POMC a través de la acción inhibitoria del ácido γ -aminobutírico a nivel del ARC (Timper & Brüning, 2017). La MCH y prepro-orexina se expresan en el hipotálamo lateral e integran efectos orexigénicos, aunque en menor medida que el NPY y el AgRP. De hecho, existe evidencia de que la ablación del hipotálamo lateral y dorsomedial en ratones, o bien, modelos murinos knockout para el gen MCH, muestran hipofagia y decremento de peso. Las orexinas son neuropéptidos regulan positivamente la ingesta de alimentos y son de los principales reguladores del ciclo de sueño. Están localizadas dentro y alrededor del área hipotalámica lateral, por lo que este sitio es descrito como uno de los principales reguladores del sueño (Kalra et al., 1999; Millington, 2007; Vianna & Coppari, 2011).

Las neuronas POMC se proyectan principalmente a neuronas de segundo orden en el PVN, pero también al hipotálamo dorsomedial, el hipotálamo lateral y el hipotálamo ventromedial (Kalra et al., 1999). Por su parte, las neuronas de segundo orden procesan la información y se proyectan a múltiples neurocircuitos fuera del hipotálamo (Roh et al., 2016). La destrucción del PVN y el hipotálamo ventromedial induce una sobrealimentación y consecuente obesidad (Kamegai et al., 2001; Leibowitz et al., 1981). Al ingerir alimentos, el POMC se escinde en α -MSH, que se libera de los axones de las neuronas POMC y activa los receptores MC3/4R de las neuronas del PVN principalmente, resultando en una disminución en la ingesta de alimento y un aumento en el gasto de energía (Könner et al., 2009). Los mediadores cascada abajo que participan en la transducción de los efectos de la activación de MC4R para la regulación de la ingesta de alimentos son el factor neurotrófico derivado del cerebro, la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Timper & Brüning, 2017). También se ha observado que la activación del MC4R induce una mayor actividad del sistema nervioso simpático que conduce a la activación del tejido adiposo pardo (Voss-Andreae et al., 2006).

Las neuronas POMC y AgRP / NPY expresan receptores para hormonas metabólicas periféricas como la insulina y la leptina. La insulina se secreta a partir de células β pancreáticas tras la ingesta de nutrientes y representa el principal regulador de la glucosa y los lípidos, por lo que tiene un papel importante en la regulación del peso. Por otra parte, la insulina puede causar aumento de peso a través del efecto directo sobre el tejido adiposo y afectando el apetito a través de la hipoglucemia (Woods et al., 1997).

Además, la insulina disminuye las concentraciones de glucosa, la gluconeogénesis y la lisis de glucógeno en el hígado, y favorece el ingreso de la glucosa al músculo estriado y al tejido adiposo. También favorece la síntesis de triglicéridos en el hígado y en el tejido adiposo (Sims et al., 1973; Steinberger, 2001). A nivel hipotalámico, se ha demostrado que la insulina estimula a las neuronas POMC (Qiu et al., 2014). La eliminación de los receptores de insulina y de leptina de las neuronas POMC deteriora la homeostasis de la glucosa y conduce a la resistencia sistémica a la insulina (Hill et al., 2010; Vicent et al., 2018). También se ha demostrado la participación de la insulina y la leptina en las neuronas POMC promoviendo la diferenciación de la grasa blanca a grasa parda (& Buettner, 2017). Además, se ha demostrado que la acción de la insulina en las neuronas POMC controla la lipólisis del tejido. En las neuronas AgRP/NPY la insulina induce una hiperpolarización y una tasa de activación disminuida, lo que reduce la liberación de AgRP y otros neurotransmisores, afecta la inervación hepática periférica e induce una mayor expresión de IL-6 en el hígado (Könner & Brüning, 2012).

La leptina derivada de tejido adiposo se libera en el plasma en niveles proporcionales a las reservas de grasa de todo el cuerpo y es inducida por la insulina, interviene en la saciedad a largo

plazo a través de la cuantificación de las reservas energéticas globales del organismo (Myers & Olson, 2012; Russell et al., 2001). Es considerada una hormona antiobesidad, actuando como una señal de adiposidad de retroalimentación negativa para controlar la homeostasis

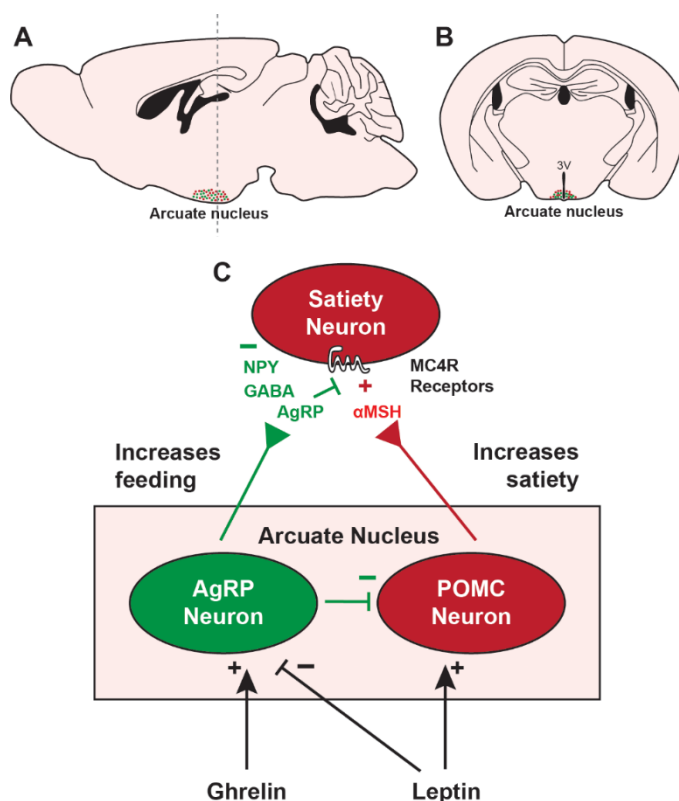


Figura 1. Control de la ingesta de alimentos por el núcleo arqueado del hipotálamo (Tomado de Vicent, 2018). Las neuronas inhibitoras del apetito POMC (rojo) contienen péptidos como la hormona estimulante de melanocitos α MSH, que actúa sobre los receptores MC3 y MC4. Las neuronas estimulantes del apetito en el ARC (verde) contienen NPY, que actúa sobre los receptores Y (Y1 e Y5), y el AgRP, que es un antagonista de la actividad del receptor MC3/4.

energética al unirse a sus receptores en el hipotálamo, disminuyendo la ingesta de alimento y así induciendo la pérdida de peso (Elmqvist et al., 1998). La leptina estimula directamente las neuronas POMC e induce la expresión de POMC, mientras ejerce un efecto inhibitorio sobre las neuronas AgRP/NPY y la expresión de AGRP (Sohn et al., 2013).

La grelina es una hormona gastrointestinal que también presenta un papel fundamental en la regulación del peso corporal. Se secreta predominantemente desde el estómago durante la inanición y estimula la alimentación activando las neuronas AgRP/NPY, además de promover el aumento de peso corporal y la adiposidad a través de los efectos directos sobre las neuronas del PVN (Andrews, 2011).

Estrés psicogénico (generalidades y efectos sobre metabolismo)

El estrés psicogénico se define como una experiencia emocional negativa acompañada de cambios bioquímicos, fisiológicos, cognitivos y conductuales predecibles que se dirigen ya sea hacia la alteración del suceso estresante o la adaptación a sus efectos, con el fin de mantener la homeostasis del organismo (Baum, 1990; McEwen, 2005; Stratakis & Chrousos, 1995). El mantenimiento de la homeostasis en presencia de diferentes estresores requiere de la activación de respuestas que implican al sistema inmune, nervioso y endocrino.

En la actualidad, existe evidencia que discute ciertos aspectos de la teoría de Selye. No todos los estímulos estresantes provocan la misma respuesta del síndrome general de adaptación en todos los organismos, si no que la repuesta al estrés varía de acuerdo con el tipo de estresor y al tiempo de exposición. También se debe considerar que la magnitud de la respuesta y sus consecuencias fisiológicas se ven influidas en gran medida por la percepción del individuo y su capacidad para controlar la presencia o intensidad del estímulo estresor (Kim & Diamond, 2002). El eje HPA y los nervios adrenérgicos tienen diferentes patrones de respuesta en relación con el tipo de estímulo estresante (Goldstein et al., 2002). Por consecuencia, el estrés se puede dividir en agudo y crónico con base en su tiempo de exposición, y cada uno se caracterizará por distintos cambios fisiológicos.

El estrés agudo se define como eventos individuales de estrés que duran minutos u horas. Este tipo de estrés suele potenciar la respuesta inmune, mientras que el estrés de tipo

crónico es inmunosupresivo (Dhabhar, 2000). El aumento en los niveles de catecolaminas, como la epinefrina y la norepinefrina, son un indicador de estrés agudo (Gow et al., 2010). Por su parte, el estrés crónico se define como una serie de eventos múltiples de estrés que duran varias horas al día durante semanas o meses. Un marcador importante del estrés crónico es una desregulación del ritmo circadiano del cortisol (Dhabhar, 2009; McEwen, 2005). El estrés crónico puede generar cambios conductuales como variaciones en la ingesta de alimento y peso corporal, ansiedad y depresión (Bartolomucci et al., 2004; Bourke & Neigh, 2011; Ruis et al., 2001). Al estar sometidos a estrés crónico, fisiológicamente se activa el eje HPA para la producción de glucocorticoides (Sharpley et al., 2009).

Bases biológicas de la respuesta al estrés

El cuerpo responde al estrés liberando diversas hormonas: Adrenocorticotropina (ACTH) de la pituitaria, glucocorticoides de la corteza suprarrenal y las catecolaminas epinefrina de la médula suprarrenal y norepinefrina de los nervios simpáticos. Estas hormonas sirven para adaptar el cuerpo al factor estresor (Axelrod & Reisine, 1984).

El hipotálamo es crucial en la respuesta independientemente del tipo de estrés. La información de estos estímulos se integra en el núcleo paraventricular del hipotálamo (PVN), una región del cerebro crucialmente involucrada en la respuesta al estrés. Por una parte, se da la activación del eje simpático-adrenal-medular (SAM) para la liberación de catecolaminas (Fig. 2). El eje SAM inicia cuando las neuronas preganglionares simpáticas de la médula espinal reciben la información procedente del hipotálamo activando la rama simpática; esta activación genera cambios dirigidos a preparar al cuerpo para el esfuerzo físico. La activación de las neuronas postganglionares simpáticas produce la liberación de norepinefrina que es segregada en la médula suprarrenal y en el hipotálamo, sistema límbico, hipocampo y córtex cerebral. Por otra parte, las neuronas preganglionares simpáticas activan la médula de las glándulas adrenales liberando a la circulación epinefrina y en menor medida norepinefrina. Estas catecolaminas estimulan los receptores α (1–2) y β (1–3) expresados en diferentes blancos centrales y periféricos. (Bitsika et al., 2014; Smeets, 2010).

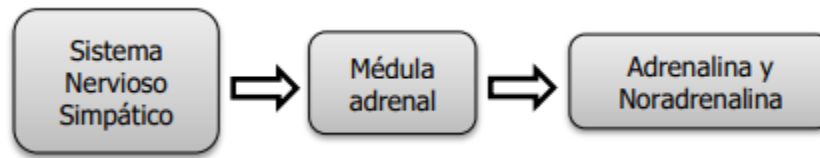


Figura 2. Sistema Nervioso Simpático. Al ser estimulado por un estresor, el hipotálamo activa la médula adrenal. La médula adrenal es parte del sistema nervioso autónomo. La médula adrenal secreta la hormona adrenalina y prepara al cuerpo para una respuesta de lucha o huida. La reacción fisiológica incluye un aumento de la frecuencia cardíaca.



Figura 3. Eje hipotalámico pituitario adrenal. Esta respuesta se caracteriza por la liberación hipotalámica de la CRH. El CRH se une a su receptor en la glándula pituitaria anterior y se libera ACTH. La ACTH se une a los receptores de la corteza adrenal y estimula la liberación los glucocorticoides cortisol y corticosterona.

Las catecolaminas tienen un papel central en los eventos relacionados con el estrés en un organismo. Alertan al organismo provocando un aumento de la frecuencia cardíaca, vasoconstricción periférica, aumento de la glicemia, dilatación pupilar, hiperventilación y aumento del volumen sanguíneo preparando al organismo para la respuesta de “lucha o huida” (Arun, 2004). La liberación asociada de epinefrina y norepinefrina suprimen la liberación de insulina pancreática y estimulan la liberación de glucagón, lo que conduce a un aumento de la relación glucagón a insulina (Molina y Ashman 2013). La norepinefrina, en conjunto con otros neurotransmisores, se ha encontrado relacionado con la excitación, la atención, el estado de ánimo, el aprendizaje, la memoria y la respuesta al estrés (Huether, 1996; Sved et al., 2001).

Por otra parte, la activación del eje HPA promueve la liberación de glucocorticoides (Fig. 3). La activación del eje HPA después del estrés de tipo agudo tiene un efecto protector, mientras que la hiperactivación constante de este circuito es desfavorable para el individuo y puede causar diversas patologías. En especial, se sabe que a nivel central se estimulan las neuronas de la región medial parvocelular del PVN y producen el factor liberador de catecolaminas (CRF). Cuando el CRF llega a la glándula pituitaria (hipófisis anterior) se activa el eje HPA el cual producirá la hormona adrenocorticotropa (ACTH). La ACTH

circulante actúa sobre los receptores de melanocortina 2 en la zona fascicular de la corteza suprarrenal, estimulando la síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol en humanos y corticosterona en roedores) (Armario, 2006; Kovács et al., 2005). Estos actúan en varios tejidos a través de los receptores de mineralocorticoides y glucocorticoides y ejercen una retroalimentación negativa sobre el eje HPA suprimiendo la respuesta al estrés (Sapolsky et al., 2000). Su liberación a la circulación tiene efectos sobre el metabolismo y el sistema inmune del organismo (Guyton & Hall, 2006), que ayudan a descomponer las proteínas y a convertirlas en glucosa, y por otra parte estimulan la conversión de las grasas en energía, aumentan el flujo sanguíneo y estimulan las respuestas conductuales (Carlson, 1996).

Efecto del estrés psicogénico sobre el peso corporal

Existe una gran cantidad de antecedentes en roedores que muestran que el estrés físico y psicosocial reducen la ingesta de alimento y como consecuente el peso corporal relacionado de forma directa a la gravedad del estrés (Harris et al., 2006; Martí et al., 1994; Pastor-Ciurana et al., 2014; Rybkin et al., 1997; Vallès et al., 2000). Una sola exposición a estrés agudo por restricción de movimiento o por inmovilización induce la reducción del peso corporal que puede prolongarse por más de 10 días, incluso después de reestablecer los hábitos alimenticios (Rybkin et al., 1997; Vallès et al., 2000). Además, se ha visto que los efectos sobre el peso corporal y la conducta alimentaria se pueden prolongar si se expone de forma repetida a estrés crónico. En el caso de las ratas, se ha encontrado que, después de someterse a un protocolo de restricción de movimiento durante tres días, no pueden recuperar su peso en comparación al de los controles sin estrés incluso después de 80 días de que finalizó el protocolo y se normalizó su alimentación. Esto muestra que, después del estrés, las ratas aparentemente tienen la capacidad de volver a la ingesta calórica normal y, por lo tanto, también debe modificarse su gasto energético. Sin embargo, aunque las ratas con estrés crónico no logran alcanzar el peso de los controles, se ha demostrado que solo pierden peso durante los primeros días, pero después comienzan a ganar peso de nuevo. Esto demuestra que el estrés crónico puede proteger de las consecuencias negativas de un estresor intenso pero agudo (Harris et al., 2006).

También se ha demostrado que después de aplicarse un protocolo de estrés crónico, las ratas no muestran los efectos anoréxicos esperados después de una exposición posterior a inmovilización, lo que sugiere adaptaciones metabólicas que protegen de las reducciones inducidas por el estrés en el peso corporal. Por lo tanto, aunque el estrés intenso parece inducir la pérdida inmediata de peso corporal, existen mecanismos compensatorios que restablecen el equilibrio energético (Pastor-Ciurana et al., 2014). En ratones BALB/c, se ha observado que la respuesta a estrés crónico por restricción de movimiento es dependiente de sexo, donde las hembras sometidas a estrés presentan una ganancia de peso e ingesta menor en relación al grupo control, mientras que los machos no muestran cambios en su ganancia de peso, pero sí un aumento en su ingesta respecto a los controles (Vázquez-Cruz, 2018). La influencia del estrés psicogénico sobre el peso corporal en roedores es mediada por diferentes factores incluyéndola citocina interleucina 6, la cual es de interés ya que otra de las características observadas en nuestro estudio preliminar de estrés en ratones BALB/c es la ausencia de IL-6 por las hembras de esta cepa.

La interleucina 6 en la respuesta al estrés crónico

La interleucina 6 (IL-6) es una citocina pleiotrópica producida por células inmunes durante la inflamación, y por células no inmunes en la regulación del metabolismo y la composición corporal. La IL-6 de ratón está compuesta por 187 aminoácidos y solo comparte un 42% de homología con la citoquina humana. De manera similar, la homología entre la IL-6 humana y de rata es del 41% a nivel de aminoácidos. Tanto en condiciones inflamatorias como no inflamatorias, la IL-6 puede ser liberada de células endoteliales, fibroblastos, queratinocitos, osteoblastos, miocitos, adipocitos, células B pancreáticas y otros tejidos (Kamimura et al., 2003; Van Snick, 1990).

La IL-6 tiene un papel central en la regulación de la inflamación, hematopoyesis, respuesta inmune y mecanismos de defensa del huésped. Más específicamente, en los procesos inflamatorios, esta citocina pleiotrópica se encuentra involucrada en la regulación positiva de las proteínas de fase aguda (p. ej. proteína c reactiva, factores del complemento, ferritina, hepcidina, entre otros) en el hígado, la inducción de crecimiento y diferenciación de diversas células, la activación de células T, la estimulación de la hematopoyesis, la

diferenciación de macrófagos y células dendríticas, y el reclutamiento de leucocitos. Por otro lado, la IL-6 también es esencial para la atenuación de la inflamación al promover la síntesis de citocinas antiinflamatorias (Hoene & Weigert, 2008). Por lo tanto, la IL-6 se encuentra clasificada como una citocina pro y antiinflamatoria.

En condiciones de estrés físico o psicológico, se ha podido observar un aumento de la expresión de IL-6 en plasma en humanos y roedores. Se ha demostrado que, en ratones macho C57BL/6, el estrés por restricción de movimiento induce la expresión de ARNm de IL-6 en el bazo e hígado, seguido de un incremento del nivel sérico de IL-6 (Kitamura et al., 1997). También es conocido que IL-6 estimula la secreción de la ACTH la cual es una hormona representativa de la respuesta al estrés (Guma & Brewer, 2008). También se ha demostrado que la norepinefrina puede inducir la expresión de IL-6 en células epiteliales gástricas en condiciones de estrés (Yang et al., 2014). Como la IL-6 induce proteínas de fase aguda junto con glucocorticoides y regula la secreción de varias hormonas de tejidos neuroendocrinos y endocrinos, el aumento de IL-6 en plasma inducido por estrés ha sido relacionado con el mantenimiento de la homeostasis (Zhou et al., 1993).

La IL-6 y regulación del peso corporal

Además de su importante función en la inflamación, la IL-6 también tiene sitios importantes de secreción y acción en el tejido adiposo y el músculo esquelético, y participa en la regulación de sus funciones metabólicas (Pedersen et al., 2003). En la Tabla 1 se resumen los principales hallazgos respecto al papel de la IL-6 en la regulación del peso corporal. Se ha demostrado que una administración única de IL-6 de forma intracerebroventricular (i.c.v) aumenta el gasto de energía, cuando se compara con la administración intraperitoneal. Sin embargo, el tratamiento crónico con IL-6 de forma i.c.v. y también de forma intraperitoneal (i.p.) disminuye el peso corporal y de grasa, y los niveles séricos de leptina (Wallenius et al. 2002; Timper et al. 2017). Se ha encontrado que las principales neuronas hipotalámicas que contienen neuropéptidos implicadas en la homeostasis energética expresan el ARNm del receptor de IL-6, y la deficiencia de IL-6 en ratones disminuye la expresión de algunos neuropéptidos encontrados en el PVN del hipotálamo, como la hormona liberadora de corticotropina, la cual es anorexigénica (Benrick et al., 2009). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la IL-6 tiene efectos antiobesidad.

Estudios con ratones C57BL/6 deficientes de IL-6 desarrollan un perfil obeso, mostrando resistencia a la insulina y leptina (Wallenius et al. 2002). Sin embargo, hay estudios que reportan resultados contradictorios sobre el papel de la IL-6. Di Gregorio et al. (2004) realizó experimentos bajo las mismas condiciones sobre la misma cepa de ratones que utilizó Wallenius et al. (2002) y encontró una disminución del peso corporal en los ratones deficientes de IL-6 y no observó resistencia a la insulina ni leptina. La razón de los resultados contradictorios obtenidos con ratones deficientes en IL-6 en los dos estudios aún no está clara. Por su parte, Ferrer et al. (2014) ha demostrado diferencias dependientes del sexo en la regulación del peso mediada por IL-6. En este caso, los machos deficientes de IL-6 mostraron una menor ganancia de peso corporal en relación con los sujetos silvestres, mientras que en las hembras se observa el fenotipo inverso. A nivel hipotalámico, encontraron que en los machos deficientes de IL-6 había un aumento de prepro-orexina, mientras que en las hembras deficientes de IL-6, había un aumento de AgRP y NPY, y una disminución de POMC y CRH, lo que explica la diferencia en las variaciones del peso corporal entre los sexos.

Tabla 1. Principales antecedentes referentes al efecto de la IL-6 en la regulación del peso corporal.

Cepa	Tejido	Resultados	Referencia
C57BL/6 IL6^{-/-}	KO total de IL-6	Hembras IL6 ^{-/-} mostraron un fenotipo obeso con aumento de grasa corporal, aumento de leptina basal menor tolerancia a la glucosa y resistencia a la leptina. Aumento de ingesta de alimento en ratones macho de 13 semanas. Administración de IL-6 i.p. en hembras IL6 ^{-/-} durante 8 semanas redujo peso corporal y leptina. Los niveles de triglicéridos aumentaron en ratones hembra IL6 ^{-/-} , pero no en machos.	(Wallenius et al. 2002)
C57BL/6 IL6^{-/-} (igual a Wallenius)	KO total de IL-6	Ambos sexos IL6 ^{-/-} no desarrollan fenotipo relacionado a la obesidad y la diabetes. IL6 ^{-/-} de 3 semanas mostraron menor peso corporal que los WT. Aumento en la adiponectina en IL6 ^{-/-} , pero sin cambios en insulina, leptina, glucosa y triglicéridos.	(Di Gregorio et al., 2004)
Mlc-Cre^{+/-} IL-6^{lox/+} C57BL/6	KO IL-6 músculo	mIL-6 KO machos ganan menos peso y grasa corporal, patrón opuesto al observado en las hembras. Sin cambios en la ingesta de alimento, pero machos y hembras mIL-6 KO fueron más y menos activos, respectivamente. Machos mIL-6 KO tienen un aumento de prepro-orexina, mientras que en hembras hay un aumento de AgRP y NPY.	(Ferrer et al., 2014)
1f(Mlc)-Cre C57BL/6	KO IL-6 músculo	Machos mIL-6 KO mostraron reducción de grasa y peso corporal e ingesta; menor temperatura corporal en la fase diurna y aumento del índice de intercambio respiratorio. Hembras mIL-6 KO aumentaron el gasto energético, aunque no hubo diferencias en su peso.	(Molinero et al., 2017)
C57BL/6N	Administración de IL-6 i.c.v e i.p.	IL-6 i.c.v suprime la alimentación incluso en ratones con dieta alta en grasas vía IL-6 trans-signaling. Bajas concentraciones de IL6 periférica (i.p. 400 ng deIL-6) no afecta la ingesta de alimento, aunque altas concentraciones (i.p. 50 ng/g IL-6) tienen efecto supresor en la alimentación).	(Timper et al., 2017)
aP2-Cre-ERT2 C57BL/6	KO IL-6 tejido adiposo	Hembras IL-6 KO alimentados con HFD ganaron menos peso y grasa corporal, caso no observado en machos. NPY y AgRP aumentaron en machos IL-6 KO y disminuyeron en hembras. PGC-1a se incrementó en hembras KO induciendo gasto energético.	(Navia et al., 2014)
GFAP-IL-6 C57BL/6	IL-6 expresada de forma constitutiva en astrocitos	Hembras GFAP-IL6 mostraron una expresión reducida de neuropéptidos orexigénicos, mientras que en los machos solo se observó un aumento en la CRH.	(Chida et al., 2006)

JUSTIFICACIÓN

La regulación del peso corporal es un fenómeno de importancia tanto en individuos sanos y quienes sufren enfermedades crónicas, a pesar de esto aún se desconoce la totalidad de mecanismos regulatorios involucrados y en particular el papel de la IL-6, una citocina pleiotrópica de gran importancia en la respuesta inmunológica que también participa en la regulación del metabolismo, de acuerdo a numerosos estudios realizados en la última década. En dichos estudios se han empleado modelos animales diversos pero los más comunes son los roedores, ratas y ratones, de los cuales existen diferentes cepas silvestres y también cepas modificadas genéticamente, ratones transgénicos y mutantes que permiten estudiar la función de proteínas específicas en metabolismo y homeostasis energética. En contraste, las cepas consanguíneas silvestres son consideradas buenos modelos de estudio ya que su fondo genético es homogéneo lo que minimiza las variaciones inter-individuales. Sin embargo, la consanguinidad de las cepas silvestres tiene un aspecto negativo, produce fenotipos característicos de cada cepa que deben considerarse durante el diseño de estudios para la correcta interpretación de los resultados obtenidos, uno de estas características fenotípicas es el peso corporal. La cepa de ratones BALB/c es la segunda más empleada en investigación biomédica, después de C57BL/6, y es descrita en la literatura como resistente a la obesidad, si bien las causas de este fenotipo solo se conocen parcialmente. Este trabajo contribuirá a una caracterización más completa de esta cepa de ratones, además de aportar conocimiento sobre la participación del sistema inmune en la regulación del peso corporal en los mamíferos.

HIPÓTESIS

La IL-6 sistémica participa en la regulación del peso corporal de ratones BALB/c hembra.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la IL-6 sistémica participa en la regulación del peso corporal y metabolismo de la glucosa en ratones de la cepa BALB/c sometidos a estrés crónico, en forma dependiente del sexo.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Confirmar que el estrés crónico afecta diferencialmente a hembras y machos BALB/c en tres indicadores de mantenimiento del peso corporal, ganancia de peso, índice de masa corporal e ingesta de alimento.
2. Determinar si el estrés crónico afecta el metabolismo posprandial de la glucosa en ratones BALB/c de ambos sexos.
3. Evaluar el efecto del estrés crónico sobre los niveles plasmáticos de IL-6 y citocinas inflamatorias en ratones BALB/c de ambos sexos bajo diferentes condiciones.
4. Evaluar la participación del sistema nervioso simpático en el metabolismo posprandial de la glucosa y de composición corporal por estrés crónico en hembras BALB/c.
5. Determinar si la IL-6 circulante restaura el metabolismo posprandial y previene las alteraciones en composición corporal inducidas por estrés crónico en ratones hembra de la cepa BALB/c

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Se emplearon ratones BALB/c de ambos sexos, de 10-12 semanas de edad al inicio de los experimentos, los cuales fueron proporcionados por el bioterio del Laboratorio de Inmunología y Virología de la UANL. Se mantuvieron en jaulas microventiladas con acceso a agua y alimento *ad libitum* con un ciclo luz/oscuridad de 12 h (6 A.M. - 6 P.M.), a una temperatura ambiental controlada de 22 °C y humedad relativa de 45%. Todos los procedimientos de trabajo con los animales fueron aprobados por el comité interno de ética con clave CEIBA-2018-024 del Departamento de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Diseño experimental y protocolo de estrés crónico

Para llevar a cabo los 3 experimentos, los animales se distribuyeron aleatoriamente en grupos experimentales en función del sexo, la aplicación o no del estrés crónico y la administración de IL-6:

Experimento 1: Efecto del estrés crónico sobre el peso corporal de ratones BALB/c

- 1.1 Machos en condiciones normales de alojamiento (n=6)
- 1.2 Machos en condiciones de estrés crónico (n=6)
- 1.3 Hembras en condiciones normales de alojamiento (n=6)
- 1.4 Hembras en condiciones de estrés crónico (n=6)

Experimento 2: Administración de propanolol a ratones hembra BALB/c

- 3.1 Hembras en condiciones normales de alojamiento (n=6)
- 3.2 Hembras en condiciones de estrés crónico (n=6)

Experimento 3: Administración de IL-6 a ratones BALB/c

- 3.1 Hembras en condiciones normales de alojamiento (n=6)

3.2 Hembras en condiciones de estrés crónico (n=6)

Los animales de todos los grupos experimentales pasaron por un proceso de aclimatación de una semana, durante el cual se manipularon diariamente durante 5 minutos por un operador. El protocolo consistió en un paradigma de estrés crónico por restricción del movimiento por un período de 23 días según se muestra en la Tabla 2. A partir de los 84 días de edad, los ratones se expusieron a estrés por restricción de movimiento durante 4 horas diarias, de lunes a domingo, con algunos descansos como se muestra en la Tabla 2. Para lograrlo, los ratones se colocaron en forma individual en un tubo cónico de 50 mL bien ventilado, donde no tenían la posibilidad de moverse hacia adelante o hacia atrás. El procedimiento se repitió durante los siguientes 22 días. Los animales control permanecieron en sus jaulas y no se perturbó su ambiente. La inducción se realizó siempre en el mismo horario, de 11:00 A.M. a 3 P.M.

Tabla 2. Calendarización del protocolo de estrés crónico por restricción de movimiento. D=Día, S=Estrés, ST=Sacrificio y toma de muestras, W=Toma de peso corporal, RE=Estrés por restricción de movimiento, R=Reposo, X=Día de toma.

FECHA	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Jue	Vie	Sab	Dom	Lun	Mar	Mie	Jue	Vie	Sab	Dom	Lun	Mar	Mie	Jue	Vie	Sab	Dom	Lun	Mar	Mie	Jue	Vie
D	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
S	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	RE	R	RE	RE	RE
ST																							X
W	X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X		X

Administración del bloqueador adrenérgico propanolol

Se administró propanolol a ratones hembra sometidas a estrés y a sus controles en reposo. La administración se realizó 30 minutos antes del inicio del protocolo de estrés en el grupo correspondiente. Se administró diariamente una dosis de 20 mg/kg de propanolol por vía intraperitoneal (Sun et al., 2011).

Administración de IL-6 recombinante murina

Se administró IL-6 recombinante murina (SIGMA) a ratones hembra sometidas a estrés y a sus controles en reposo. La administración se realizó 30 minutos antes del inicio

del protocolo de estrés en el grupo correspondiente. Se administró diariamente una dosis de 3.2 ng/g de rIL-6 por vía intraperitoneal (Vida 2015; Timper et al., 2017)

Prueba posprandial (metabolismo de la glucosa)

Los ratones se mantuvieron en ayuno durante un periodo de 6 horas con la finalidad de realizar una prueba de tolerancia de glucosa conocida como prueba posprandial. Se realizó una determinación de glucosa en sangre mediante un glucómetro (OneTouch®), esta determinación se consideró como el tiempo 0, inmediatamente después se administró a los animales, una solución de glucosa 100 mg/mL, 0.1 mL por cada 10 gramos de peso del animal, mediante inyección en la cavidad intraperitoneal, y se hicieron determinaciones de glucosa a los 15, 30, 60 y 120 minutos. Para obtener la sangre, se cortaron 1–2 mm de tejido de la punta de la cola en la parte distal al hueso con tijeras 2 horas antes de obtener la primera muestra de prueba, y se obtuvo la sangre por flujo directo o masajeando suavemente la cola y recogiendo la muestra en un tubo. Las muestras subsiguientes se obtuvieron retirando suavemente la costra y repitiendo el masaje (Ayala, 2010).

Monitoreo del peso corporal y cálculo del índice de masa corporal

Se registró el peso de los animales dos veces por semana, antes de comenzar cada tratamiento de estrés, con el fin de evaluar la evolución del peso corporal. El índice de masa corporal (IMC) se calculó como el producto de dividir el peso entre el cuadrado de la longitud nariz-ano (Friedman et al., 1991).

Monitoreo de ingesta de alimento

Se registró el consumo de alimento en gramos empleando una balanza analítica, del alimento consumido cada 4 días durante todo el experimento. La ingesta de alimento se reporta como la media del consumo de alimento durante el tratamiento.

Obtención de muestras

Al finalizar el experimento los ratones se sacrificaron por punción cardiaca terminal, empleando una mezcla de ketamina/xilacina como anestésico, con una concentración de 100 mg/kg de ketamina y 10mg/kg de xilacina. La punción cardiaca

terminal se llevó a cabo utilizando jeringas de 1 mL con aguja Luer Lock de 27G*13mm, con trazas de anticoagulante EDTA. La sangre obtenida se colocó en tubos de 1.5 mL con EDTA, se dejó reposar a 37 °C durante una hora y posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min. Al finalizar se colectó el plasma y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Posterior a la punción cardiaca terminal se aseguró el sacrificio de los animales mediante dislocación cervical y se extrajo la grasa, músculo e intestino. Las muestras se congelaron en hielo seco y se guardaron a -80 °C hasta su análisis. Parte de las muestras de grasa interescapular se incluyeron en una solución de formalina al 10% para realizar la fijación de los tejidos y posteriormente, realizar se incluyeron en parafina, se realizaron cortes por medio de un micrótopo y finalmente se tiñeron con hematoxilina y eosina.

Cuantificación de la grasa corporal

Una vez extraídas las muestras de grasa, se pesaron y se calculó el porcentaje respecto al peso total. Se multiplicó por 100 el peso del tejido y se dividió entre el peso total del animal

Cuantificación de los niveles plasmáticos de IL-6

Los niveles de citocinas plasmáticas se determinaron por citometría de flujo con el equipo BD Accuri C6 (Becton-Dickinson Biosciences, Ann Arbor, MI), utilizando el kit BD Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) y el nivel de citocinas se determinó con el programa FCAP Array Software V 3.0 (Soft Flow Hungary, Ltd., Pécs, Hungary). Se analizaron 5 de las 6 muestras de plasma por cada grupo control y cuatro muestras de cada grupo sometido a estrés crónico. Se emplearon 50 µL de plasma en cada caso.

Se realizó la preparación de los estándares (con una concentración de 20 a 5000 pg/mL) y las muestras. Posteriormente, se añadieron 50 µL de la mezcla de las perlas de captura a cada tubo de ensayo, 50 µL de cada estándar/muestra y 50 µL de ficoeritrina, y se incubaron 2 horas a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de esto, se realizó un lavado con 1 mL buffer de lavado y se centrifugaron los tubos durante 5 minutos a 200 g. Finalmente, se aspira el sobrenadante con mucho cuidado, se añaden otros 300 µL del buffer de lavado y se resuspendieron las perlas, para la lectura en el citómetro de flujo.

Análisis estadístico

Para revelar los efectos del estrés crónico a lo largo del tiempo, los datos se analizaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) bifactorial de medidas repetidas (ANOVA) y se utilizó la prueba post hoc Student-Newman-Keul (SNK). Para los demás casos se utilizó un ANOVA de una vía o la prueba Kruskal-Wallis en los rangos de datos que no se distribuían normalmente. Los resultados se consideraron estadísticamente significativos si los valores de P eran inferiores a 0,05. Para el análisis estadístico se empleó el software SigmaPlot 14.0 (SystatSoftware, Chicago, IL, EE. UU.).

RESULTADOS

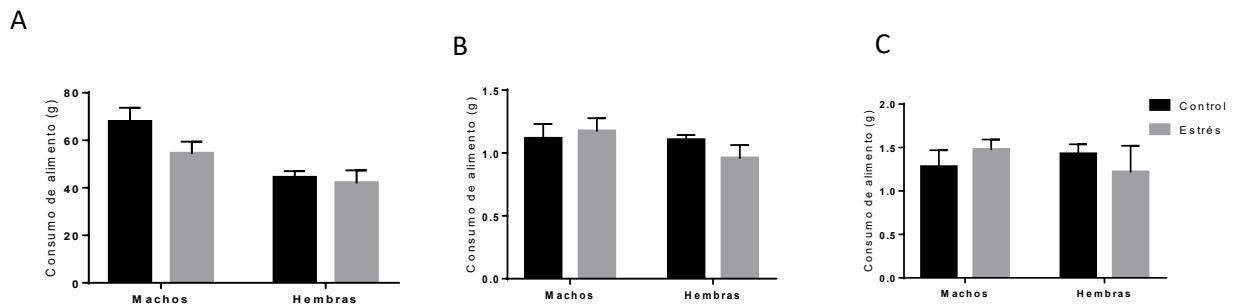
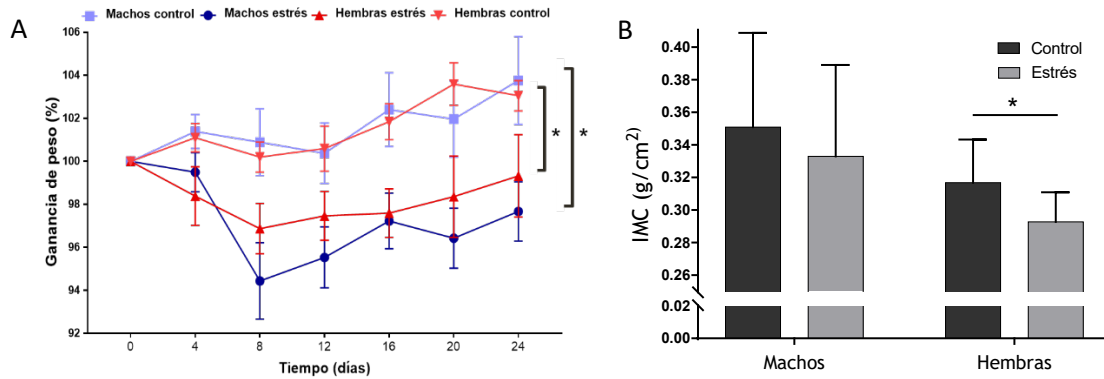
1. Efecto del estrés crónico sobre indicadores morfométricos, de composición corporal y metabólicos

Evolución del peso corporal e índice de masa corporal

Uno de los principales indicadores de los efectos del estrés crónico es la pérdida o ausencia de ganancia de peso corporal, ya que, bajo condiciones de estrés, tienen lugar cambios metabólicos en el organismo, que incluyen aquellos relacionados con un mayor gasto energético. Para determinar el efecto del estrés crónico sobre la pérdida o ganancia de peso, se midió el peso corporal de los ratones en el día inicial del protocolo (día 0), así como en los días 4, 8, 12, 16, 20 y 22. En la figura 4A se muestran los resultados obtenidos en forma de porcentaje de variación de peso, tomando el peso inicial como 100%.

El ANOVA bifactorial de medidas repetidas reveló un efecto altamente significativo del estrés sobre la progresión del peso corporal ($p=0.007$). La prueba post hoc Student–Newman–Keuls arrojó una ganancia de peso significativamente menor en ratones macho ($p=0.024$) y hembra ($p=0.028$) sometidos a estrés crónico respecto a su grupo control. En ratones sometidos a estrés crónico, se observó disminución de su peso corporal entre el día 0 y 8, con una pérdida del 5% para los machos ($p=0.028$), y un 3% para las hembras ($p=0.024$). A partir del día 12, los ratones de ambos sexos sometidos a estrés comenzaron a ganar peso, sin embargo, no lograron recuperar su peso corporal inicial (Fig. 4A).

Un importante indicador de la composición corporal es el IMC (g/cm^2), por lo que este se determinó en los cuatro grupos experimentales al final del protocolo de estrés crónico (Fig. 4B). En el grupo de ratones macho en reposo se encontró una media de IMC de $0.35 \text{ g}/\text{cm}^3$, mientras que, en el grupo de estrés crónico, se obtuvo una media de $0.33 \text{ g}/\text{cm}^3$, no encontrándose diferencia significativa entre ellas ($p=0.29$). En cuanto a los ratones hembra, el grupo en reposo presentó un IMC significativamente menor ($p=0.043$) que el grupo estrés, con medias de 0.29 y $0.32 \text{ g}/\text{cm}^3$ respectivamente (Fig. 4B).



Ingesta de alimento

Se registró el consumo de alimento a lo largo del protocolo para determinar el efecto del estrés crónico sobre la conducta alimentaria de los ratones. En los ratones macho, se observó una mayor ingesta de alimento en el grupo control, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa. De igual manera, en las hembras no se encontró una diferencia significativa en su consumo. También se realizó una prueba “fast-

refeed” para evaluar la respuesta de los ratones bajo condiciones de ayuno. No se encontraron diferencias en ningún caso.

Grasa corporal

El depósito de tejido adiposo interescapular es uno de los principales depósitos con tejido adiposo pardo mientras que en el depósito de tejido adiposo inguinal se concentra mayor tejido adiposo beige. Esta grasa parda y beige son los principales actores en disipación y desgaste de tejido adiposo por la activación de receptores B3 durante la activación de la termogénesis.

Para evaluar los efectos de estrés inducido por la restricción de movimiento, se pesó la grasa interescapular visceral e inguinal y se convirtió a porcentaje del peso corporal total. Los ratones macho disminuyeron su porcentaje de grasa inguinal bajo estrés crónico ($p=0.041$) mientras que los demás depósitos se mantuvieron sin cambios significativos. Sin embargo, en los ratones hembra sometidos a estrés se encontró disminución en los tres depósitos de grasa en comparación a su grupo control; interescapular ($p=0.044$), inguinal ($p=0.001$) y visceral ($p=0.017$) (Fig. 6).

A su vez, se analizaron por microscopía óptica los tejidos de grasa interescapular teñidos con hematoxilina eosina. En las imágenes se puede observar una clara disminución del contenido graso en los adipocitos de los grupos bajo condiciones de estrés respecto a los grupos en condiciones de reposo de ambos sexos (Fig. 7).

Efecto del estrés crónico sobre el metabolismo de la glucosa

Se realizó una prueba posprandial para evaluar la tolerancia a la glucosa de los ratones. En la prueba posprandial se observa el nivel máximo de glucosa de aproximadamente 250 mg/dL a los 15 minutos de que se administra glucosa (1 mg/kg), niveles que regresan a su estado basal después dos horas (Fig. 8A). En los ratones hembra bajo condiciones de estrés, este pico de glucosa fue menor (media, $p=0.045$), aunque recuperó su estado basal normal después de dos horas, mientras que los demás grupos no mostraron cambios en su respuesta a la glucosa. (Fig. 8B).

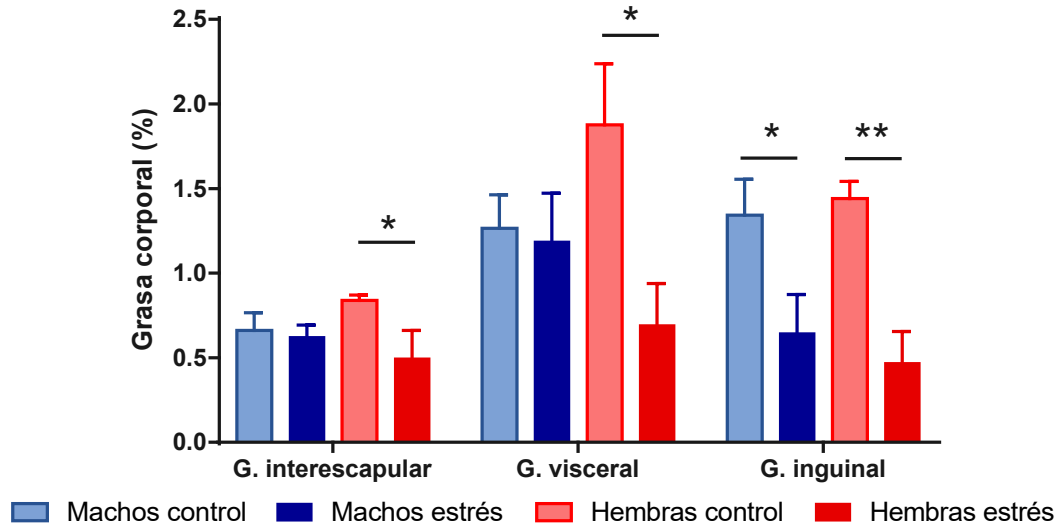


Figura 6. El estrés disminuye la grasa corporal en hembras BALB/c bajo estrés crónico. Porcentaje medio de grasa corporal respecto al peso total del ratón en los principales depósitos de tejido adiposo en los diferentes grupos de ratones macho y hembra (prueba *t* de Student). Los datos se muestran como media \pm SEM; $P \leq 0.05$ (*) y $P \leq 0.01$ (**) se considera significativo. $n = 6-8$ para cada grupo.

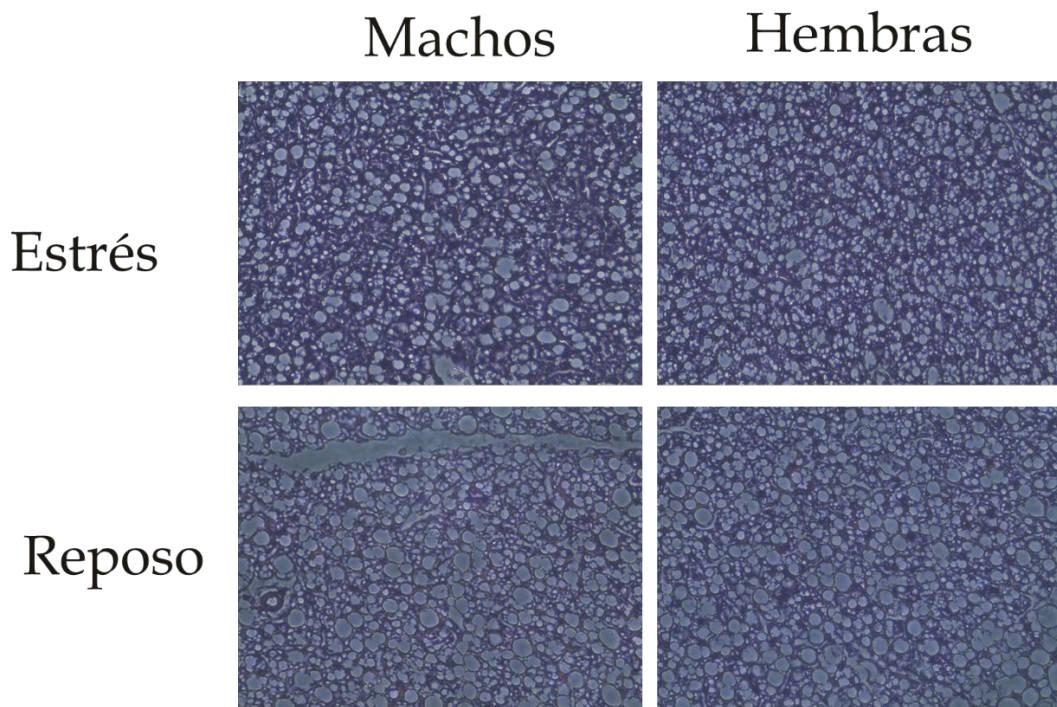


Figura 7. El estrés disminuye los depósitos de grasa interescapular de ratones BALB/c bajo estrés crónico. Cortes histológicos del tejido graso pardo teñidos con hematoxilina-eosina machos y hembras bajo condiciones de reposo y estrés. Se muestra una imagen representativa de cada grupo.

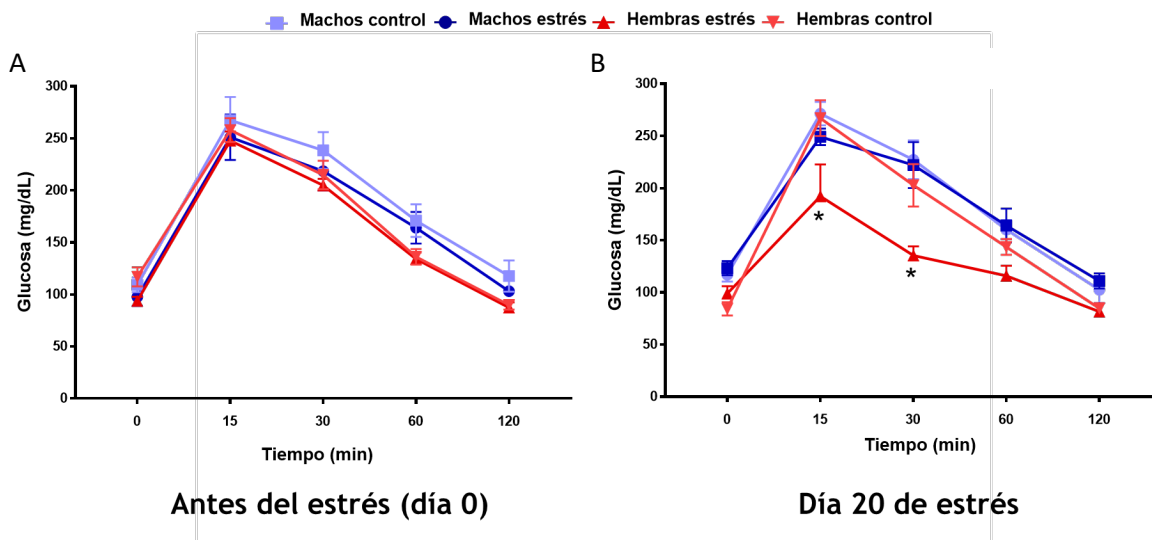


Figura 8. Prueba de tolerancia a la glucosa en ratones BALB/c bajo estrés crónico. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 6 horas y recibieron una inyección intraperitoneal de glucosa (2 mg/g de peso corporal). Las muestras fueron tomadas previo (A) y posterior (B) a tres semanas de estrés (prueba *t* de Student). Los datos se muestran como media \pm SEM; $P \leq 0.05$ (*) se considera significativo. $n = 6-8$ para cada grupo

2. Evaluar la participación del sistema nervioso simpático en alteraciones metabólicas y de composición corporal por estrés crónico en hembras BALB/c

Evolución del peso corporal e índice de masa corporal

Para determinar la participación del sistema nervioso simpático en la respuesta al estrés, se administró un antagonista adrenérgico para receptores tipo β 1-2 (propranolol) a ratones hembra sometidos a estrés y en condiciones de reposo. El ANOVA bifactorial de medidas repetidas mostró un efecto significativo del estrés y propranolol sobre la progresión del peso corporal ($p=0.002$). La prueba post hoc Student–Newman–Keuls mostró una ganancia de peso significativamente menor en ratones hembra tratados con propranolol ($p=0.049$) y con el vehículo ($p=0.004$) respecto a su grupo control. En ratones sometidos a estrés crónico, se observó disminución de su peso corporal entre el día 0 y 12, con una pérdida del 3% para los tratados con propranolol ($p=0.028$), y un 6% para las hembras ($p=0.024$). A partir del día 12, los ratones de ambos sexos sometidos a estrés comenzaron a ganar peso, pero recuperaron su peso corporal inicial; los ratones tratados

con propranolol tuvieron un peso final 1% menor a su peso inicial, mientras que un 4% menor para los tratados con el vehículo (Fig. 9A).

Respecto al IMC, el grupo de ratones hembra tratados con propranolol tuvieron una media de 0.33 g/cm³ en condiciones de estrés y 0.34 en reposo g/cm³ sin diferencias significativas. En el grupo de estrés crónico sin propranolol, se obtuvo una media de 0.31 g/cm³, siendo significativamente menor respecto a su grupo control (p=0.018) con una media de 35 g/cm³ (Fig. 9B).

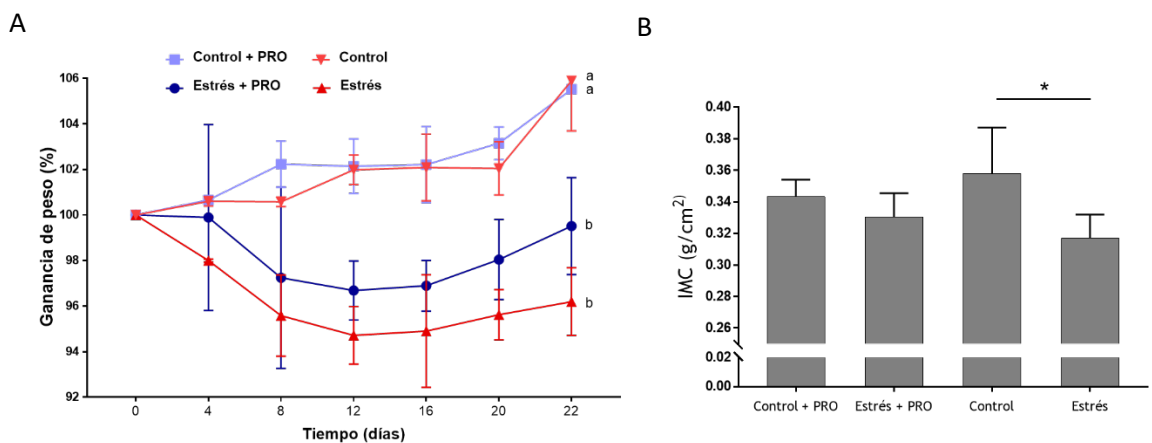


Figura 9. Efecto del propranolol sobre el peso corporal e IMC en ratones hembra BALB/c bajo condiciones de estrés crónico. A) Progresión de peso corporal en ratones hembra durante el protocolo de estrés crónico por restricción del movimiento y en condiciones de reposo tratados diariamente con propranolol. Se considera el peso inicial como 100%. (ANOVA bifactorial de medidas repetidas (P=0.007) seguido por prueba post hoc Student–Newman–Keuls; letras diferentes indican diferencia significativa, n=8) B) IMC de ratones hembra BALB/c después de 3 semanas de estrés o reposo tratados diariamente con propranolol (prueba *t* de Student; *P<0.05, n=8). Los datos se muestran como la media ± SEM. PRO: Propranolol

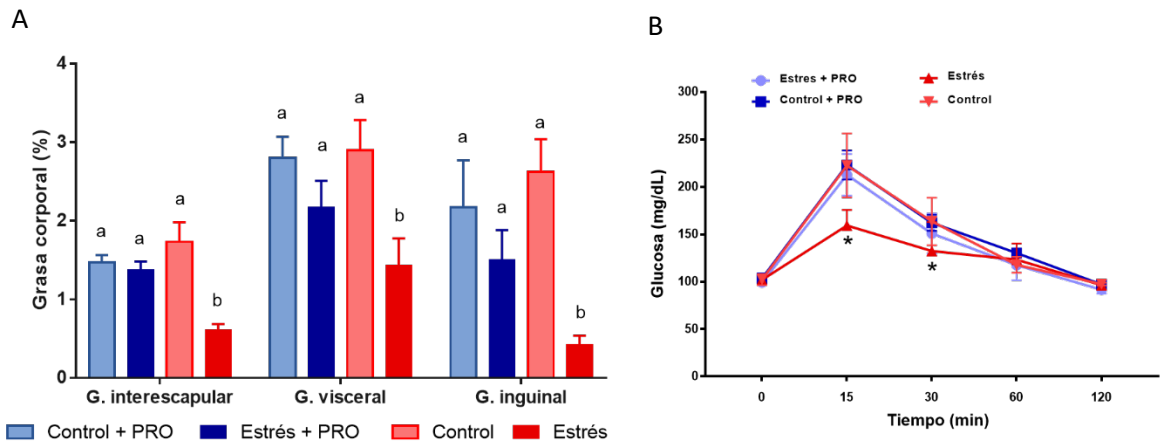


Figura 10. Efecto del propranolol sobre la grasa corporal y la tolerancia a la glucosa en ratones hembra BALB/c bajo condiciones de estrés crónico. A) Porcentaje medio de grasa corporal respecto al peso total del ratón en los principales depósitos de tejido adiposo en ratones tratados con propranolol (prueba *t* de Student). Los datos se muestran como media \pm SEM; letras distintas representan $P \leq 0.05$, $n = 6-8$ para cada grupo. B) Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratones bajo estrés crónico tratados con propranolol. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 6 horas y recibieron una inyección intraperitoneal de glucosa (2 mg/g de peso corporal; prueba *t* de Student). Los datos se muestran como media \pm SEM; $P \leq 0.05$ (*) se considera significativo, $n=6-8$. PRO: Propranolol

Grasa corporal y metabolismo de la glucosa

Los ratones hembra sometidos a estrés crónico sin tratamiento presentaron una disminución en su porcentaje de grasa inguinal interescapular ($p=0.005$), inguinal ($p=0.002$) y visceral ($p=0.029$) de manera significativa. Por el contrario, el grupo tratado con propranolol no presentó pérdida en sus depósitos de grasa a pesar del protocolo de estrés crónico (Fig. 10A).

En la prueba posprandial, en forma similar a lo observado con anterioridad, en los ratones hembra bajo condiciones de estrés se observó un pico de glucosa a los 15 minutos significativamente menor ($P < 0.001$) en comparación al grupo en control, sin embargo, se observó una respuesta normal a la glucosa al administrar propranolol en los ratones incluso al ser sometidos al protocolo de estrés crónico. (Fig.10B).

3. Efecto de la administración de IL-6 recombinante en las alteraciones metabólicas y de composición corporal inducidas por estrés crónico en ratones BALB/c hembras

Para evaluar el efecto de la IL-6 en la respuesta al estrés, se administró IL-6 recombinante a ratones hembra sometidos a estrés y en condiciones de reposo. El ANOVA bifactorial de medidas repetidas reveló un efecto altamente significativo de los tratamientos sobre la progresión del peso corporal ($p < 0.001$). La prueba post hoc Student–Newman–Keuls mostró una pérdida de peso significativa en ratones hembra sometidos a estrés ($p = 0.004$) respecto a su grupo control. De manera similar, los ratones tratados con IL-6 tuvieron una menor ganancia de peso estando en condiciones de reposo ($p < 0.001$) y de estrés crónico ($p < 0.001$) en comparación al grupo en reposo sin tratamiento. En los ratones sometidos tratados con IL-6 bajo condiciones de estrés crónico y en reposo, y en ratones estresados sin tratamiento, se observó disminución de su peso corporal entre el día 0 y 8, con una pérdida de peso corporal del 7 ($p < 0.001$), 6 ($p = 0.003$) y 5% ($p = 0.012$) respectivamente. A partir del día 12, los grupos que mostraron pérdida comenzaron a ganar peso sin lograron recuperar su peso corporal inicial (Fig. 11A).

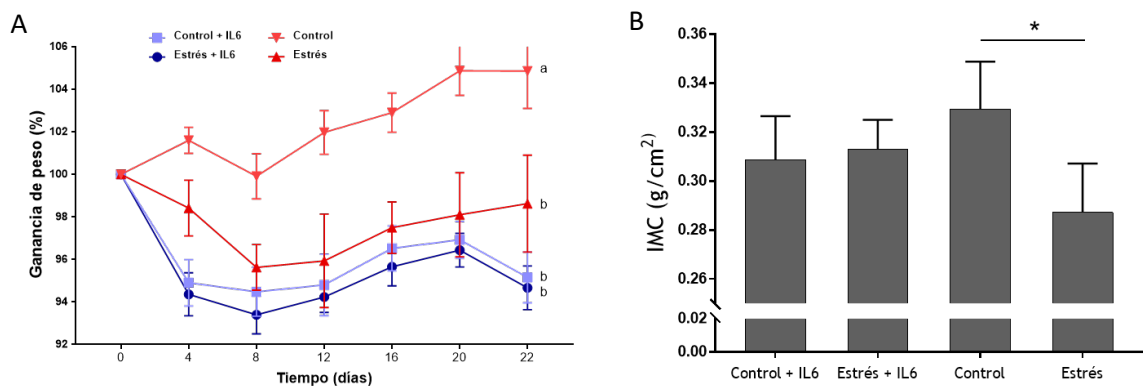


Figura 11. Efecto de la administración de IL-6 sobre el peso corporal e IMC bajo condiciones de estrés crónico en ratones hembra. A) Progresión de peso corporal en ratones hembra durante el protocolo de estrés crónico por restricción del movimiento y en condiciones de reposo tratados diariamente con IL-6. Se considera el peso inicial como 100%. (ANOVA bifactorial de medidas repetidas ($P < 0.001$) seguido por prueba post hoc Student–Newman–Keuls; letras diferentes indican diferencia significativa $n = 5$) B) IMC de ratones hembra BALB/c después de 3 semanas de estrés o reposo tratados diariamente con propanolol (prueba t de Student; $*P < 0.05$, $n = 5$). Los datos se muestran como la media \pm SEM.

El grupo de ratones hembra tratados con IL-6 tuvieron un IMC medio de 0.30 g/cm³ en condiciones de estrés y 0.31 en reposo g/cm³ sin diferencias significativas. En el grupo de estrés crónico sin tratamiento, se obtuvo una media de 0.29 g/cm³, siendo significativamente menor respecto a su grupo control (p=0.007) con una media de 33 g/cm³ (Fig. 11B).

Grasa corporal y metabolismo de la glucosa

Los ratones hembra sometidos a estrés crónico sin tratamiento disminuyeron su porcentaje de grasa inguinal interescapular (p=0.036), inguinal (p=0.002) y visceral (p<0.001) de manera significativa. Por el contrario, el grupo tratado con IL-6 no mostró pérdida en sus depósitos de grasa a pesar de haberse sometido al protocolo de estrés crónico (Fig. 12A).

En la prueba posprandial, los ratones hembra bajo condiciones de estrés tuvieron un pico de glucosa a los 15 minutos significativamente menor (p<0.001) en comparación al grupo en control, sin embargo, se observó una respuesta normal a la glucosa al administrar IL-6 en incluso al ser sometidos al protocolo de estrés crónico. (Fig. 12B).

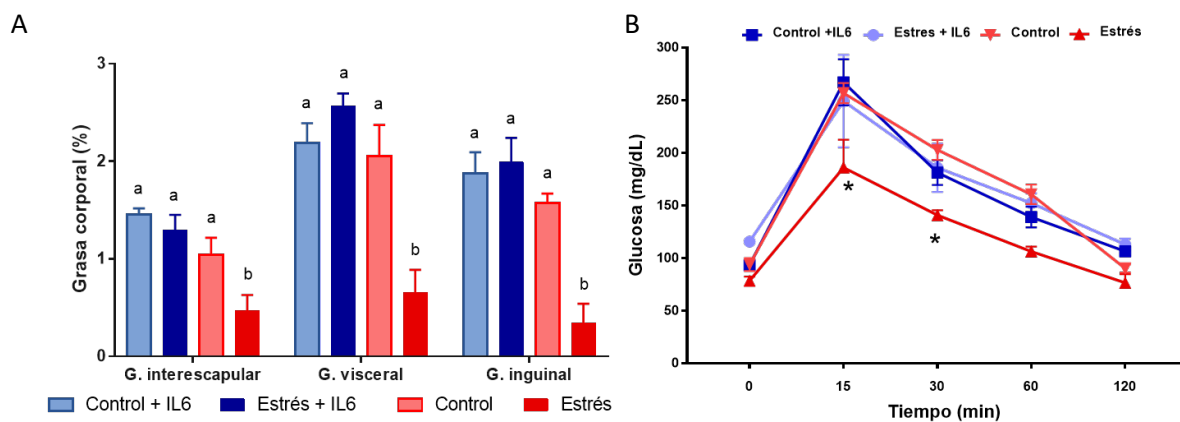


Figura 12. Efecto de la administración de IL-6 la grasa corporal y la tolerancia a la glucosa en ratones hembra BALB/c bajo condiciones de estrés crónico. A) Porcentaje medio de grasa corporal respecto al peso total del ratón en los principales depósitos de tejido adiposo en ratones tratados con IL6 (prueba *t* de Student). Los datos se muestran como media ± SEM; letras distintas representan $P \leq 0.05$, $n = 6-8$ para cada grupo. B) Prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratones bajo estrés crónico tratados con IL6. Los ratones se mantuvieron en ayunas durante 6 horas y recibieron una inyección intraperitoneal de glucosa

(2 mg/g de peso corporal; prueba *t* de Student). Los datos se muestran como media \pm SEM; $P \leq 0.05$ (*) se considera significativo, $n=6-8$. IL6: Interleucina 6.

4. Citocinas plasmáticas

Con el objetivo de obtener información sobre posibles cambios en la respuesta inmune a nivel sistémico adicionales a las variaciones en la IL-6, se determinaron también los niveles de IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ e IL-4 en plasma por medio de citometría de flujo. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 13.

Los ratones macho sometidos a estrés mostraron una media de IL-6 plasmática de 71.23 pg/mL, a diferencia del grupo de machos en condiciones de reposo donde no se detectaron niveles de IL-6 ($p=0.044$). Los ratones hembra bajo estrés y en reposo tratados con IL-6 tuvieron medias de 143.90 y 124.45 pg/mL respectivamente, siendo significativamente diferentes en comparación con los ratones hembra bajo estrés ($p < 0.001$ y $p=0.002$) y en reposo ($p=0.001$ y $p=0.002$) sin tratamiento. Se observó un aumento en los niveles de citocinas plasmáticas de IL-17 (116.91 pg/mL), IFN- γ (29.77 pg/mL), IL-4 (33.36 pg/mL) y TNF (116.92 pg/mL) en los ratones macho bajo estrés respecto al grupo de machos en reposo ($p=0.048$, $p=0.026$, $p=0.041$, $p < 0.001$). La IL-10 no tuvo cambios significativos en ningún caso.

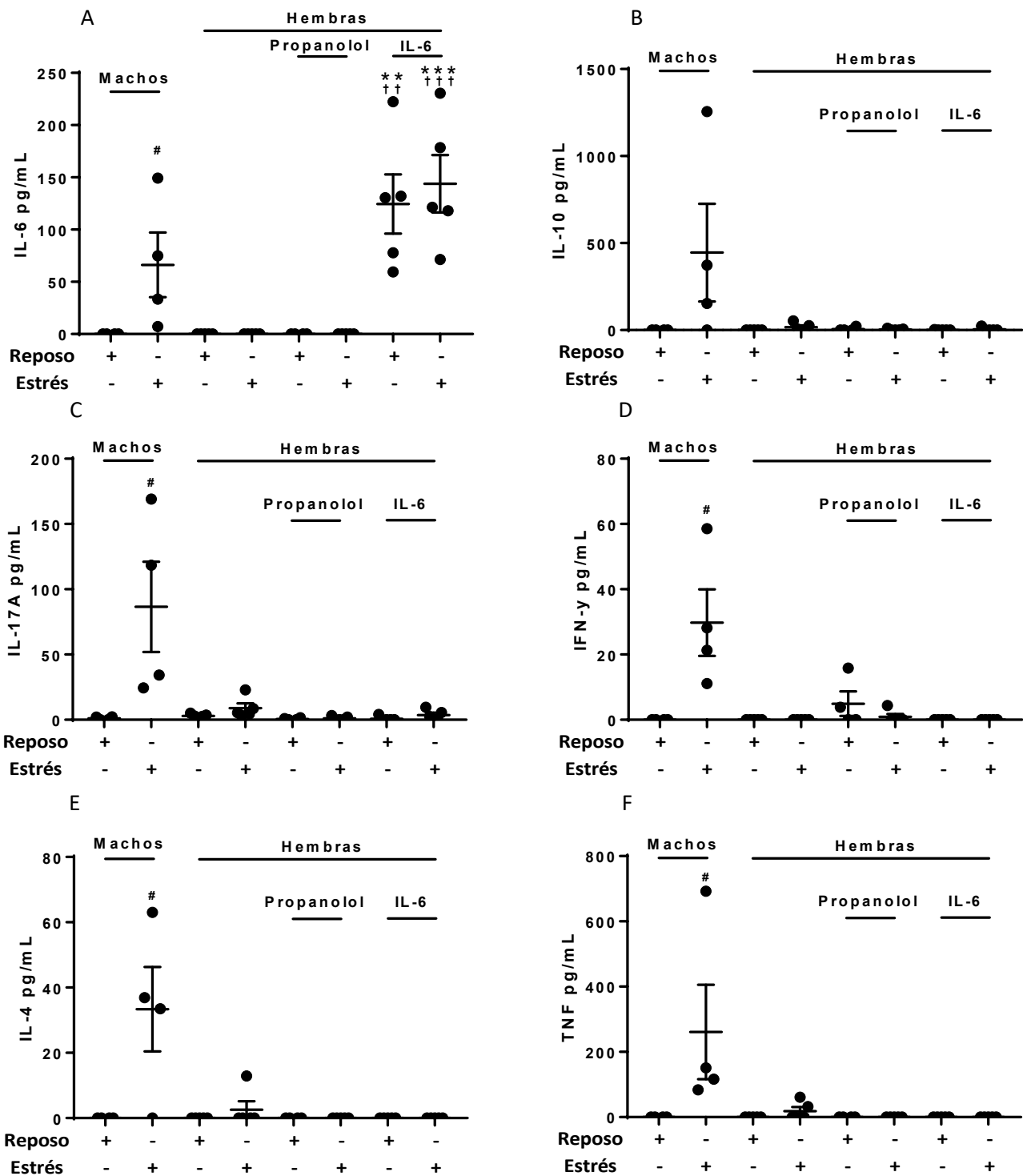


Figura 13. Niveles plasmáticos de citocinas en ratones BALB/c bajo condiciones de reposo y estrés crónico y dos tratamientos. Niveles plasmáticos (pg/mL) de IL-6 (A), IL-10 (B), IL-17A (C), TNF (D), IFN- γ (E) e IL-4 (F) analizados en muestras de suero de ratones BALB/b bajo condiciones de estrés o reposo tratados con propranolol o IL-6 (prueba *t* de Student). Los datos se muestran como media \pm SEM. # = $P \leq 0.05$ vs machos en reposo; ** = $P \leq 0.01$ y *** = $P \leq 0.001$ vs hembras en reposo; †† = $P \leq 0.01$ y ††† = $P \leq 0.001$ vs hembras bajo estrés.

DISCUSIÓN

Uno de los principales indicadores de la exposición al estrés crónico son las alteraciones en el peso de los organismos, en el caso de este estudio, ratones. Estas alteraciones son un indicador de que un protocolo de estrés está teniendo efectos fisiológicos (Hall et al, 2014; Liu et al, 2013). En este trabajo, cuando evaluamos el efecto del estrés sobre el peso corporal de ratones BALB/c se encontró un peso significativamente menor en los ratones sometidos a estrés crónico respecto a los que se mantuvieron en reposo. Por su parte, el IMC de los ratones macho no mostró diferencia significativa, mientras que el grupo de ratones hembra presentó un IMC significativamente menor respecto a su grupo en reposo. Varios estudios han demostrado que las exposiciones al estrés crónico por restricción de movimiento reducen el peso corporal, así como el IMC en ratones macho ICR, C57BL/6 y otros roedores (Gamaro et al., 2003; Jeong et al., 2013; Marin et al., 2007; Martí et al., 1994). Sin embargo, en los ratones hembra no está del todo claro cómo es que afecta al peso corporal. Schmidt et al. (2010) no encontraron cambios en el peso de ratones hembra CD1 al someterlos a estrés crónico social mientras que, contrario a esto y similar a lo encontrado en este proyecto, Iñiguez et al. (2018) hembras C57BL/6 observaron una disminución de peso acompañado de un estado de anhedonia. Bartolomucci et al., (2009) menciona que los efectos pueden variar dependiendo de la cepa, el tipo de estresor y el estatus social del animal en su grupo.

Diversos modelos de estrés crónico han sido aplicados en roedores para determinar su efecto en la alimentación y han encontrado que, bajo estas condiciones, aumenta la ingesta de alimento y la preferencia por dietas altas en grasas en las cepas de ratones C57B1/6J y CRFR2 KO (Pankevich *et al.* 2011; Teegarden y Bale 2009). Este efecto se ha asociado a un aumento en los niveles de grelina, la cual aumenta en condiciones de estrés crónico, produciendo un aumento en la ingesta calórica y en el comportamiento eliminando los efectos depresivos del estrés (Lutter *et al.* 2008). Sin embargo, en nuestro modelo con la cepa BALB/c, los ratones de ambos sexos bajo estrés crónico mantuvieron una ingesta promedio similar a los ratones en reposo, por lo que los cambios en su peso e IMC no están relacionados a su conducta alimentaria. Este resultado contrasta con lo observado en un trabajo preliminar de este grupo de investigación, donde se encontró un

aumento de ingesta de alimento en los machos sometidos a estrés crónico, dicha conducta no se observó en las hembras (Vázquez-Cruz, 2018). El primero objetivo de nuestro proyecto se enfocó en confirmar la observación previa puesto que nuestra hipótesis es que un cambio en la conducta alimenticia protegió al ratón macho estresado de la pérdida de peso, lo cual no sucedió en las hembras, esta hipótesis, además, se apoyaba en la observación de cambios significativos en niveles de leptina en los machos, y la ausencia de IL-6 en respuesta al estrés crónico en las hembras. Esta discrepancia tiene como probable explicación fuentes adicionales de estrés en las instalaciones de alojamiento de los ratones de estudio.

Como parte del experimento, se evaluó el efecto del estrés crónico sobre el metabolismo de la glucosa mediante una prueba posprandial o prueba de tolerancia a la glucosa. En el presente estudio, el nivel de glucosa posprandial en sangre en ratones BALB/c hembras bajo estrés crónico era menor en comparación con el grupo en reposo en la prueba de tolerancia a la glucosa, mientras que los machos no presentaron esta diferencia. Lim et al. (2016) evaluaron el efecto de un modelo de depresión inducida por restricción de movimiento en ratones ICR machos y, opuesto a nuestro modelo en BALB/c, encontraron niveles de glucosa posprandial sanguíneos menores en los ratones macho sometidos a estrés, aunque no lo evaluaron en ratones hembra. En su trabajo, utilizaron el fármaco clonidina para inhibir el eje HPA y disminuir los niveles de corticosterona en sangre, encontrando que, a menor corticosterona en sangre, había menores niveles de glucosa en sangre en la prueba posprandial. Adicional a esto, Boi et al. (2017) han encontrado que en las hembras BALB/c se puede distinguir un subconjunto de ratones genéticamente intactos que son altamente resistentes a volverse obesos y suelen mostrar menores niveles de glucosa al ser sometidos a una dieta alta en grasas. De acuerdo a Boi (2017) esta disparidad del subconjunto no se debió a diferencias en la ingesta de energía, sino a diferencias en el gasto de energía, indicado por una menor eficiencia energética en los ratones resistentes. Esto evidencia que los cambios provocados por el estrés están mayormente ligados a problemas metabólicos más que a su conducta alimentaria. Este estudio es una referencia importante para nuestro trabajo, puesto que aporta evidencia de alteraciones en la homeostasis energética de la cepa BALB/c, además de reportar la ausencia de respuesta inmunológica asociada con obesidad en el

subconjunto de ratones identificados como resistentes a la obesidad, sin embargo el estudio de Boi et al (2017) tiene algunas limitaciones, la primera es que solamente estudiaron hembras de la cepa, una segunda limitación es que su análisis del metabolismo de la glucosa se restringió a glucosa en ayuno, un detalle adicional es la ausencia de los resultados del análisis de niveles de citocinas a pesar de referir este análisis en la sección de material y métodos de su publicación.

También se midió el contenido de tejido adiposo de algunos depositos clave. Los machos no tuvieron cambios en su porcentaje de grasa al ser sometidos al protocolo de estrés crónico, pero las hembras mostraron disminución de sus depósitos de grasa interescapular, inguinal y visceral. Esto podría estar relacionado con la disminución de los niveles de glucosa encontrados en la prueba posprandial, ya que esto puede provocar un déficit energético que se compensa con el gasto del tejido graso. Se ha demostrado que el estrés por restricción de movimiento es capaz de inducir la producción de norepinefrina, la cual es capaz de estimular la lipólisis y así compensar la falta de glucosa para cubrir las necesidades energéticas (Fleshner & Crane, 2017; Tavernier et al., 2005).

Debido a lo encontrado anteriormente, se evaluó el papel de la norepinefrina y el SNS en esta respuesta, utilizando el beta-bloqueador no selectivo propanolol en ratones hembra sometidos a estrés crónico, con el objetivo de inhibir la acción de la norepinefrina sobre los receptores beta adrenérgicos 1 y 2. La ganancia de peso se comportó de manera similar que en los ratones que no se sometieron a la administración del propanolol y ya se ha demostrado que los efectos de este fármaco son independientes de cambios en el peso corporal en ratas y ratones (da Silva Franco et al., 2017; Zaidi et al., 2020). Sin embargo, el IMC de los ratones hembra sometidos a estrés crónico y tratadas con propanolol se mantuvo estable, a diferencia del grupo en estrés no tratado con propanolol. Estos cambios se vieron reflejados en los depósitos de grasa, ya que las hembras sometidas a estrés tratadas con propanolol mantuvieron un porcentaje de grasa normal a diferencia del grupo en estrés sin el tratamiento de propanolol. A este respecto, los receptores beta adrenérgicos 1 y 2 se expresan ampliamente en los tejidos del cuerpo, mientras que los beta 3 predominan en el tejido adiposo y es la activación de estos receptores la que conduce a la lipólisis (Collins & Surwit, 2001). A pesar de esto, el propanolol fue capaz de inhibir el

consumo del tejido adiposo en los ratones hembra cuando se sometieron a estrés. Es importante notar que los ratones hembra estresados tratados con propranolol recuperaron su respuesta a la glucosa normal esto significa que no se produjo un déficit energético lo que explicaría que los depósitos de grasa no fueran afectados. Se ha visto también que infusiones de norepinefrina y epinefrina en condiciones de ejercicio producen incrementos en la producción y absorción de glucosa, aunque no se ha evaluado bajo condiciones de estrés (Nonogaki, 2000). Por lo tanto, también es posible que la norepinefrina este alterando la tolerancia a la glucosa en los ratones estresados, lo que pudimos contrarrestar mediante el uso del propranolol.

La IL-6 es una citocina característica en la respuesta al estrés y estimula el eje HPA, provocando un aumento en la producción de glucocorticoides (Guma y Brewer 2008). Observaciones anteriores hechas en nuestro laboratorio indican que ratones hembra de la cepa BALB/c sometidas a estrés crónico por restricción de movimiento pierden peso con disminución en su IMC, sin mostrar diferencias en los niveles de IL-6 a diferencia de los ratones macho que muestran una respuesta normal de IL-6 ante estrés, elevación. Por lo tanto, en el presente estudio se administró esta citocina de forma intraperitoneal en ratones hembra sometidos a estrés crónico. Los ratones tratados con IL-6 tuvieron una pérdida de peso en condiciones de estrés y reposo, indicando que esta pérdida es independiente al estrés. Sin embargo, el IMC no se vio afectado al administrarse IL-6 en estrés y reposo. Similar a los resultados obtenidos con el propranolol, la IL-6 fue capaz de normalizar la respuesta a la glucosa y mantener un porcentaje normal de grasa en los ratones sometidos a estrés. La IL-6 inducible por estrés se produce a partir de adipocitos marrones en una forma dependiente del receptor beta-3-adrenérgico, siendo la señal instructiva requerida para mediar la hiperglucemia a través de la gluconeogénesis hepática, acción que podría explicar la normalización de los niveles de glucosa en las hembras después de la administración de IL-6 (Qing et al., 2020). Esta citocina se ha encontrado ligada a una disminución en la ingesta de alimento y como consecuencia, una disminución del peso corporal al ser administrada por vía intracerebroventricular, aunque en nuestro caso no se encontraron cambios en la conducta alimentaria (Shirazi *et al.* 2013; Wallenius *et al.* 2002). Por otro lado, se ha observado que, en ratones deficientes de esta citocina en tejido adiposo, tienden a ganar menos peso y grasa corporal al consumir dieta

alta en grasas, indicando que la IL-6 tendrá un efecto distinto dependiendo del tejido sobre el que actué y las condiciones bajo las que se encuentre el animal (Navia et al., 2014).

Al evaluar los niveles de citocinas bajo las diferentes condiciones de este estudio, se encontró que los machos, al ser sometidos a estrés crónico, presentaban una elevación en sus niveles plasmáticos de IL-6, mientras que las hembras no mostraban esta citocina ni en valores altos, tal como se había observado con anterioridad (Vázquez-Cruz, 2018). En los ratones sometidos a estrés crónico con pre-tratamiento con propranolol, no se observó

En los ratones sometidos a estrés crónico y que se les administró IL-6 por vía intraperitoneal no solo se reflejó en una elevación de los niveles plasmáticos, los datos sugieren que estimuló la producción de esta misma citocina en ratones hembra en condiciones de reposo y estrés, ya que sus niveles plasmáticos eran mayores a los que se administraron. Li et al. (2009) menciona que el tratamiento de células hepáticas con IL-6 da como resultado una fosforilación sostenida del STAT3, por lo tanto, se puede suponer que el STAT3 inducida por IL-6 puede unirse al elemento STAT3 dentro de la secuencia promotora de IL-6 y posteriormente estimular la producción de IL-6 por otras células que, en su caso, fue comprobado utilizando la línea celular HT-29, indicando que la misma IL-6 es capaz de estimular su propia producción. A su vez, diversos estudios han mostrado que la expresión del receptor alfa de IL-6 en los hepatocitos es necesario para una respuesta normal al estrés (Hodes et al., 2014; Niraula et al., 2019).

CONCLUSIONES

Los ratones hembra de la cepa BALB/c presentan alteraciones en el metabolismo posprandial de glucosa bajo condiciones de estrés crónico por restricción de movimiento. Estas alteraciones se observan en la absorción de glucosa y se acompañan de una disminución del peso corporal e IMC. Este efecto está mediado por la activación del SNS con la participación de los receptores beta adrenérgicos 1 y 2.

El efecto del estrés crónico sobre la glucosa posprandial pudo ser abolido por la administración intraperitoneal de IL-6. Además, la IL-6 en hembras produce pérdida de peso corporal de forma independiente del estrés y previene la pérdida de tejido adiposo. Por lo tanto. La IL-6 circulante participa en el mantenimiento del metabolismo posprandial de la glucosa y la composición corporal de hembras de la cepa BALB/c bajo estrés crónico.

BIBLIOGRAFÍA

- Andrews, Z. B. (2011). Central mechanisms involved in the orexigenic actions of ghrelin. *Peptides*, 32(11), 2248–2255.
<https://doi.org/10.1016/j.peptides.2011.05.014>
- Armario, A. (2006). The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: what can it tell us about stressors? *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 5(5), 485–501.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17073652>
- Arun, C. P. (2004). Fight or flight, forbearance and fortitude: The spectrum of actions of the catecholamines and their cousins. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1018, 137–140. <https://doi.org/10.1196/annals.1296.016>
- Axelrod, J., & Reisine, T. D. (1984). Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, 224(4648), 452–459. <https://doi.org/10.1126/science.6143403>
- Balthasar, N., Dalgaard, L. T., Lee, C. E., Yu, J., Funahashi, H., Williams, T., Ferreira, M., Tang, V., McGovern, R. A., Kenny, C. D., Christiansen, L. M., Edelstein, E., Choi, B., Boss, O., Aschkenasi, C., Zhang, C. Y., Mountjoy, K., Kishi, T., & Elmquist, J. K. (2005). Divergence of melanocortin pathways in the control of food intake and energy expenditure. *Cell*, 123(3), 493–505.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.035>
- Bartolomucci, A., Cabassi, A., Govoni, P., Ceresini, G., Cero, C., Berra, D., Dadomo, H., Franceschini, P., Dell’Omo, G., Parmigiani, S., & Palanza, P. (2009). Metabolic consequences and vulnerability to diet-induced obesity in male mice under chronic social stress. *PLoS ONE*, 4(1), e4331. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004331>
- Bartolomucci, A., Pederzani, T., Sacerdote, P., Panerai, A. E., Parmigiani, S., & Palanza, P. (2004). Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, 29(7), 899–910.
<https://doi.org/10.1016/j.psyneuen.2003.08.003>
- Baum, A. (1990). Stress , Intrusive Imagery , and Chronic Distress. *Health Psychology*, 9(6), 653–675.

- Benrick, A., Schéle, E., Pinnock, S. B., Wernstedt-Asterholm, I., Dickson, S. L., Karlsson-Lindahl, L., & Jansson, J.-O. (2009). Interleukin-6 Gene Knockout Influences Energy Balance Regulating Peptides in the Hypothalamic Paraventricular and Supraoptic Nuclei. *Journal of Neuroendocrinology*, *21*(7), 620–628. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01879.x>
- Betley, J. N., Cao, Z. F. H., Ritola, K. D., & Sternson, S. M. (2013). Parallel, redundant circuit organization for homeostatic control of feeding behavior. *Cell*, *155*(6), 1337–1350. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.002>
- Bitsika, V., Sharpley, C. F., Sweeney, J. A., & McFarlane, J. R. (2014). HPA and SAM axis responses as correlates of self- vs parental ratings of anxiety in boys with an Autistic Disorder. *Physiology and Behavior*, *127*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2013.12.011>
- Boi, S. K., Buchta, C. M., Pearson, N. A., Francis, M. B., Meyerholz, D. K., Grobe, J. L., & Norian, L. A. (2017). Obesity alters immune and metabolic profiles: new insight from obese-resistant mice on high fat diet Shannon. *Physiology & Behavior*, *176*(12), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.03.040>
- Bourke, C. H., & Neigh, G. N. (2011). Behavioral effects of chronic adolescent stress are sustained and sexually dimorphic. *Hormones and Behavior*, *60*(1), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2011.03.011>
- Carlson, N. R. (1996). *Fundamentos de psicología fisiológica* (3rd ed.). Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A.
- Chida, D., Osaka, T., Hashimoto, O., & Iwakura, Y. (2006). Causes Obesity in Young Mice. *Growth (Lakeland)*, *55*(April), 971–977. <https://doi.org/10.2337/diabetes.55.04.06.db05-1250>
- Collins, S., & Surwit, R. S. (2001). The β -adrenergic receptors and the control of adipose tissue metabolism and thermogenesis. *Recent Progress in Hormone Research*, *56*, 309–328. <https://doi.org/10.1210/rp.56.1.309>
- da Silva Franco, N., Lubaczeuski, C., Guizoni, D. M., Victorio, J. A., Santos-Silva, J. C.,

- Brum, P. C., Carneiro, E. M., & Davel, A. P. (2017). Propranolol treatment lowers blood pressure, reduces vascular inflammatory markers and improves endothelial function in obese mice. *Pharmacological Research*, *122*, 35–45.
<https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.05.018>
- De Luis, D. A., Aller, R., Izaola, O., Gonzalez Sagrado, M., & Conde, R. (2006). Influence of ALA54THR polymorphism of fatty acid binding protein 2 on lifestyle modification response in obese subjects. *Annals of Nutrition and Metabolism*, *50*(4), 354–360. <https://doi.org/10.1159/000094299>
- Dhabhar, F. S. (2000). Acute Stress Enhances While Chronic Stress Suppresses Skin Immunity: The Role of Stress Hormones and Leukocyte Trafficking. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *917*(1), 876–893. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05454.x>
- Dhabhar, F. S. (2009). Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: Implications for immunoprotection and immunopathology. *NeuroImmunoModulation*, *16*(5), 300–317. <https://doi.org/10.1159/000216188>
- Di Gregorio, G. B., Hensley, L., Lu, T., Ranganathan, G., & Kern, P. A. (2004). Lipid and carbohydrate metabolism in mice with a targeted mutation in the IL-6 gene: absence of development of age-related obesity. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *287*(1), E182–E187.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00189.2003>
- Elmqvist, J. K., Bjørbaek, C., Ahima, R. S., Flier, J. S., & Saper, C. B. (1998). Distributions of Leptin Receptor mRNA Isoforms in the Rat Brain. *J. Comp. Neurol*, *395*(February), 535–547. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(19980615\)395:4<535::AID-CNE9>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(19980615)395:4<535::AID-CNE9>3.0.CO;2-2) [pii]
- Ferrer, B., Navia, B., Giralt, M., Comes, G., Carrasco, J., Molinero, A., Quintana, A., Señarís, R. M., & Hidalgo, J. (2014). Muscle-specific interleukin-6 deletion influences body weight and body fat in a sex-dependent manner. *Brain, Behavior, and Immunity*, *40*, 121–130. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.03.001>
- Fleshner, M., & Crane, C. R. (2017). Exosomes, DAMPs and miRNA: Features of Stress

- Physiology and Immune Homeostasis. *Trends in Immunology*, 38(10), 768–776.
<https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.002>
- Friedman, J. M., Leibel, R. L., Siegel, D. S., Walsh, J., & Bahary, N. (1991). Molecular mapping of the mouse ob mutation. *Genomics*, 11(4), 1054–1062.
- Gamaro, G. D., Manoli, L. P., Torres, I. L. S., Silveira, R., & Dalmaz, C. (2003). Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. *Nerochemistry International*, 42(2), 107–114.
- Goldstein, D. S., Mcewen, B., & Section, C. N. (2002). The International Journal on the Biology of. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 5(786945523), 55–58. <https://doi.org/10.1080/10253890290012345>
- Gow, R., Thomson, S., Rieder, M., Van Uum, S., & Koren, G. (2010). An assessment of cortisol analysis in hair and its clinical applications. *Forensic Science International*, 196(1–3), 32–37. <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2009.12.040>
- Gropp, E., Shanabrough, M., Borok, E., Xu, A. W., Janoschek, R., Buch, T., Plum, L., Balthasar, N., Hampel, B., Waisman, A., Barsh, G. S., Horvath, T. L., & Bruning1, J. C. (2005). Agouti-related peptide–expressing neurons are mandatory for feeding. *Nature Neuroscience*, 8(10), 1289–1291. <https://doi.org/10.1038/nn1548>
- Guma, N., & Brewer, W. (2008). Relative Adrenal Insufficiency in the Critical Care Setting. *Compendium*, 30(12), 1–9.
- Guyton, A. C., & Hall, J. E. . (2006). *Textbook of Medical Physiology*. Elsevier.
- Harris, R. B. S., Palmondon, J., Leshin, S., Flatt, W. P., & Richard, D. (2006). Chronic disruption of body weight but not of stress peptides or receptors in rats exposed to repeated restraint stress. *Hormones and Behavior*, 49(5), 615–625.
<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2005.12.001>
- Hill, J. W., Elias, C. F., Fukuda, M., Williams, K. W., Berglund, E. D., Holland, W. L., Cho, Y. R., Chuang, J. C., Xu, Y., Choi, M., Lauzon, D., Lee, C. E., Coppari, R., Richardson, J. A., Zigman, J. M., Chua, S., Scherer, P. E., Lowell, B. B., Brüning, J. C., & Elmquist, J. K. (2010). Direct Insulin and Leptin Action on Pro-

opiomelanocortin Neurons Is Required for Normal Glucose Homeostasis and Fertility. *Cell Metabolism*, 11(4), 286–297.

<https://doi.org/10.1016/j.cmet.2010.03.002>

Hodes, G. E., Pfau, M. L., Leboeuf, M., Golden, S. A., Christoffel, D. J., Bregman, D., Rebusi, N., Heshmati, M., Aleyasin, H., Warren, B. L., Labonté, B., Horn, S., Lapidus, K. A., Stelzhammer, V., Wong, E. H. F., Bahn, S., Krishnan, V., Bolaños-Guzman, C. A., Murrrough, J. W., ... Russo, S. J. (2014). Correction: Individual differences in the peripheral immune system promote resilience versus susceptibility to social stress (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (2014) 111, 45 (16136-16141) DOI: 10.1073/pnas.14. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 111(52), 18799. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423575112>

Hoene, M., & Weigert, C. (2008). The role of interleukin-6 in insulin resistance, body fat distribution and energy balance. *Obesity Reviews*, 9(1), 20–29.

<https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2007.00410.x>

Huether, G. (1996). The central adaptation syndrome: Psychosocial stress as a trigger for adaptive modification of brain structure and brain function. *Progress in Neurobiology*, 48(6), 569–612. [https://doi.org/10.1016/0301-0082\(96\)00003-2](https://doi.org/10.1016/0301-0082(96)00003-2)

Iñiguez, S. D., Flores-Ramirez, F. J., Riggs, L. M., Alipio, J. B., Garcia-Carachure, I., Hernandez, M. A., Sanchez, D. O., Lobo, M. K., Serrano, P. A., Braren, S. H., & Castillo, S. A. (2018). Vicarious Social Defeat Stress Induces Depression-Related Outcomes in Female Mice. *Biological Psychiatry*, 83(1), 9–17.

<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.07.014>

Jeong, J. Y., Lee, D. H., & Kang, S. S. (2013). *Original Article Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight , Food Intake , and Hypothalamic Gene Expressions in Mice*. 28(4), 288–296.

Kalra, S. P., Dube, M. G., Horvath, T. L., Pu, S., Kalra, P. S., & Xu, B. (1999). Interacting Appetite-Regulating Pathways in the Hypothalamic Regulation of Body Weight 1. *Endocrine Reviews*, 20(1), 68–100.

<https://doi.org/10.1210/edrv.20.1.0357>

- Kamegai, J., Tamura, H., Shimizu, T., Ishii, S., Sugihara, H., & Wakabayashi, I. (2001). Chronic Central Infusion of Ghrelin Increases Hypothalamic Neuropeptide Y and Agouti-Related Protein mRNA Levels and Body Weight in Rats. *Diabetes*, *50*(7–12), 2438–2443. <https://doi.org/10.2337/diabetes.50.11.2438>
- Kamimura, D., Ishihara, K., & Hirano, T. (2003). IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. In Springer (Ed.), *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*. Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology. <https://doi.org/10.1007/s10254-003-0012-2>
- Kim, J. J., & Diamond, D. M. (2002). The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. *Nature Reviews. Neuroscience*, *3*(6), 453–462. <https://doi.org/10.1038/nrn849>
- Kitamura, H., Konno, a, Morimatsu, M., Jung, B. D., Kimura, K., & Saito, M. (1997). Immobilization stress increases hepatic IL-6 expression in mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *238*(3), 707–711. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.7368>
- Klok, M. D., Jakobsdottir, S., & Drent, M. L. (2007). The role of leptin and ghrelin in the regulation of food intake and body weight in humans: A review. *Obesity Reviews*, *8*(1), 21–34. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2006.00270.x>
- Könner, A. C., & Brüning, J. C. (2012). Selective insulin and leptin resistance in metabolic disorders. *Cell Metabolism*, *16*(2), 144–152. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2012.07.004>
- Könner, A. C., Klöckener, T., & Brüning, J. C. (2009). Control of energy homeostasis by insulin and leptin: Targeting the arcuate nucleus and beyond. *Physiology and Behavior*, *97*(5), 632–638. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2009.03.027>
- Kovács, K. J., Miklós, I. H., Bali, B., & Huston, J. P. (2005). Psychological and physiological stressors. *Handbook of Stress and the Brain. Part 1: The Neurobiology of Stress.*, *15*, 775–792. <https://doi.org/10.1016/S0921->

0709(05)80041-0

- Leibowitz, S. F., Hammer, N. J., & Chang, K. (1981). Hypothalamic paraventricular nucleus lesions produce overeating and obesity in the rat. *Physiology and Behavior*, 27(6), 1031–1040. [https://doi.org/10.1016/0031-9384\(81\)90366-8](https://doi.org/10.1016/0031-9384(81)90366-8)
- Li, Y. Y., Hsieh, L. L., Tang, R. P., Liao, S. K., & Yeh, K. Y. (2009). Interleukin-6 (IL-6) released by macrophages induces IL-6 secretion in the human colon cancer HT-29 cell line. *Human Immunology*, 70(3), 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.01.004>
- Lim, S. M., Park, S. H., Sharma, N., Kim, S. S., Lee, J. R., Jung, J. S., & Suh, H. W. (2016). Blood glucose regulation mechanism in depressive disorder animal model during hyperglycemic states. *Brain Research Bulletin*, 124, 116–122. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.03.014>
- Lutter, M., Sakata, I., Osborne-lawrence, S., Rovinsky, S. A., Jason, G., Jung, S., Birnbaum, S., Yanagisawa, M., Elmquist, J. K., Nestler, E. J., & Zigman, J. M. (2008). The orexigenic hormone ghrelin defends against depressive symptoms of chronic stress Michael. *Nat Neurosci*, 11(7), 752–753. <https://doi.org/10.1038/nn.2139.The>
- Marin, M. T., Cruz, F. C., & Planeta, C. S. (2007). Chronic restraint or variable stresses differently affect the behavior , corticosterone secretion and body weight in rats. *Physiology & Behavior*, 90(1), 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2006.08.021>
- 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 & Behavior*, 55(4), 747–753.
- McEwen, B. S. (2005). Stressed or stressed out: What is the difference? *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 30(5), 315–318. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223\(03\)00639-5](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0006-3223(03)00639-5)
- Millington, G. W. M. (2007). The role of proopiomelanocortin (POMC) neurones in

- feeding behaviour. *Nutrition and Metabolism*, 4, 1–16.
<https://doi.org/10.1186/1743-7075-4-18>
- Molina, P. E., & Ashman, R. (2013). *Endocrine Physiology*. McGraw-Hill Education.
- Molinero, A., Fernandez-perez, A., Mogas, A., Giralt, M., Comes, G., Fernandez-gayol, O., Vallejo, M., & Hidalgo, J. (2017). Muscle IL-6 in gender-specific metabolism. *PLoS ONE*, 12(3), 1–20.
- Myers, M. G., & Olson, D. P. (2012). Central nervous system control of metabolism. *Nature*, 491(7424), 357–363. <https://doi.org/10.1038/nature11705>
- Navia, B., Ferrer, B., Giralt, M., Comes, G., Carrasco, J., Molinero, A., Quintana, A., Leclerc, J., Hidalgo, J., Viollet, B., & Señarís, R. M. (2014). Interleukin-6 deletion in mice driven by aP2-Cre-ERT2 prevents against high-fat diet-induced gain weight and adiposity in female mice. *Acta Physiologica*, 211(4), 585–596.
<https://doi.org/10.1111/apha.12328>
- Niraula, A., Witcher, K. G., Sheridan, J. F., & Godbout, J. P. (2019). Interleukin-6 Induced by Social Stress Promotes a Unique Transcriptional Signature in the Monocytes That Facilitate Anxiety. *Biological Psychiatry*, 85(8), 679–689.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2018.09.030>
- Nonogaki, K. (2000). New insights into sympathetic regulation of glucose and fat metabolism. *Diabetologia*, 43(5), 533–549. <https://doi.org/10.1007/s001250051341>
- Pankevich, D. E., Teegarden, S. L., Hedin, A. D., Jensen, C. L., & Bale, L. (2011). Caloric restriction experience reprograms stress and orexigenic pathways and promotes binge-eating. *J Neurosci.*, 30(48), 16399–16407.
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1955-10.2010>. Caloric
- Pastor-Ciurana, J., Rabasa, C., Ortega-Sánchez, J. A., Sanchís-Ollè, M., Gabriel-Salazar, M., Ginesta, M., Belda, X., Daviu, N., Nadal, R., & Armario, A. (2014). Prior exposure to repeated immobilization or chronic unpredictable stress protects from some negative sequels of an acute immobilization. *Behavioural Brain Research*, 265, 155–162. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.02.028>

- Pedersen, B. K., Steensberg, A., Fischer, C., Keller, C., Keller, P., Plomgaard, P., Febbraio, M., & Saltin, B. (2003). Searching for the exercise factor: Is IL-6 a candidate? *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, *24*(2–3), 113–119. <https://doi.org/10.1023/A:1026070911202>
- Qing, H., Desrouleaux, R., Israni-Winger, K., Mineur, Y. S., Fogelman, N., Zhang, C., Rashed, S., Palm, N. W., Sinha, R., Picciotto, M. R., Perry, R. J., & Wang, A. (2020). Origin and Function of Stress-Induced IL-6 in Murine Models. *Cell*, *182*(2), 372–387.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.05.054>
- Qiu, J., Zhang, C., Borgquist, A., Nestor, C. C., Smith, A. W., Bosch, M. A., Ku, S., Wagner, E. J., Rønnekleiv, O. K., & Kelly, M. J. (2014). Insulin excites anorexigenic proopiomelanocortin neurons via activation of canonical transient receptor potential channels. *Cell Metabolism*, *19*(4), 682–693. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2014.03.004>
- Rodríguez, E. M., Blázquez, J. L., & Guerra, M. (2010). The design of barriers in the hypothalamus allows the median eminence and the arcuate nucleus to enjoy private milieus: The former opens to the portal blood and the latter to the cerebrospinal fluid. *Peptides*, *31*, 757–776. <https://doi.org/10.1007/s00441-004-0899-1>
- Roh, E., Song, D. K., & Kim, M. S. (2016). Emerging role of the brain in the homeostatic regulation of energy and glucose metabolism. *Experimental and Molecular Medicine*, *48*(3), e216–12. <https://doi.org/10.1038/emm.2016.4>
- Ruis, M. A. W., Te Brake, J. H. A., Engel, B., Buist, W. G., Blokhuis, H. J., & Koolhaas, J. M. (2001). Adaptation to social isolation acute and long-term stress responses of growing gilts with different coping characteristics. *Physiology and Behavior*, *73*(4), 541–551. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(01\)00548-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(01)00548-0)
- Russell, C. D., Ricci, M. R., Brodin, R. E., Magill, E., & Fried, S. K. (2001). Regulation of the leptin content of obese human adipose tissue. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, *280*(3), E399–E404. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.2001.280.3.e399>
- Rybkin, I. I., Zhou, Y., Volaufova, J., Smagin, G. N., Ryan, D. H., & Harris, R. B.

- (1997). Effect of restraint stress on food intake and body weight is determined by time of day. *The American Journal of Physiology*, 273(5 Pt 2), R1612-22.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9374801>
- Sapolsky, R. M., Romero, L. M., & Munck, a. U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses ? Preparative Actions *. *Endocrine Reviews*, 21(April), 55–89. <https://doi.org/10.1210/er.21.1.55>
- Schmidt, M. V., Scharf, S. H., Liebl, C., Harbich, D., Mayer, B., Holsboer, F., & Müller, M. B. (2010). A novel chronic social stress paradigm in female mice. *Hormones and Behavior*, 57(4–5), 415–420. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.01.010>
- Sharpley, C. F., Kauter, K. G., & Mcfarlane., J. R. (2009). An initial exploration of in vivo hair cortisol responses to a brief pain stressor: Latency, localization and independence effects. *Physiological Research*, 58(5), 757–761. <https://doi.org/1544> [pii]
- Shirazi, R., Palsdottir, V., Collander, J., Anesten, F., Vogel, H., Langlet, F., & Jaschke, A. (2013). Glucagon-like peptide 1 receptor induced suppression of food intake , and body weight is mediated by central IL-1 and IL-6. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(40), 1–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.1306799110>
- Sims, E. A., Danforth, E., Horton, E. S., Bray, G. A., Glennon, J. A., & Salans, L. B. (1973). Endocrine and metabolic effects of experimental obesity in man. *Recent Progress in Hormone Research*, 29, 457–496.
- Smeets, T. (2010). Autonomic and hypothalamic-pituitary-adrenal stress resilience: Impact of cardiac vagal tone. *Biological Psychology*, 84(2), 290–295.
<https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2010.02.015>
- Sohn, J.-W., Harris, L. E., Berglund, E. D., Liu, T., Lowell, B. B., Vong, L., Balthasar, N., Williams, K. W., & Elmquist, J. K. (2013). Melanocortin 4 Receptors Reciprocally Regulate Sympathetic and Parasympathetic Preganglionic Neurons. *Cell*, 152(3), 612–619. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.12.022>
- Steinberger, J. (2001). Insulin resistance and cardiovascular risk in the pediatric patient.

- Prog Pediatr Cardiol*, 12(2), 169–175. <https://doi.org/S1058981300000709> [pii]
- Stratakis, C. A., & Chrousos, G. P. (1995). Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 771(1), 1–18.
- Sun, H., Mao, Y., Wang, J., & Ma, Y. (2011). Effects of beta-adrenergic antagonist, propranolol on spatial memory and exploratory behavior in mice. *Neuroscience Letters*, 498(2), 133–137. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.04.076>
- Sved, A. F., Cano, G., & Patrick Card, J. (2001). Neuroanatomical specificity of the circuits controlling sympathetic outflow to different targets. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 28(1–2), 115–119. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1681.2001.03403.x>
- Tavernier, G. G., Jimenez, M., Giacobino, J.-P., Hulo, N., Lafontan, M., Muzzin, P., & Langin, D. (2005). Norepinephrine Induces Lipolysis in beta1/ beta2/ beta3-Adrenoceptor Knockout Mice. *Molecular Pharmacology*, 68(3), 793–799. <https://doi.org/10.1124/mol.105.014670.tween>
- Teegarden, S. L., & Bale, T. L. (2009). Effects of stress on dietary preference and intake are dependent on access and stress sensitivity. *Physiology & Behavior*, 93(4–5), 713–723.
- Timper, K., & Brüning, J. C. (2017). Hypothalamic circuits regulating appetite and energy homeostasis: pathways to obesity. *Disease Models & Mechanisms*, 10(6), 679–689. <https://doi.org/10.1242/dmm.026609>
- Timper, K., Denson, J. L., Steculorum, S. M., Heilinger, C., Engström-Ruud, L., Wunderlich, C. M., Rose-John, S., Wunderlich, F. T., & Brüning, J. C. (2017). IL-6 Improves Energy and Glucose Homeostasis in Obesity via Enhanced Central IL-6 trans-Signaling. *Cell Reports*, 19(2), 267–280. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.043>
- Vallès, A., Martí, O., García, A., & Armario, A. (2000). Single exposure to stressors causes long-lasting, stress-dependent reduction of food intake in rats. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*,

279(3), R1138-44. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.2000.279.3.R1138>

- Van Snick, J. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annual Review of Immunology*, 8(1), 253–278.
- Vianna, C. R., & Coppari, R. (2011). A treasure trove of hypothalamic neurocircuitries governing body weight homeostasis. *Endocrinology*, 152(1), 11–18. <https://doi.org/10.1210/en.2010-0778>
- Vicent, M. A., Mook, C. L., & Carter, M. E. (2018). POMC neurons in heat: A link between warm temperatures and appetite suppression. *PLoS Biology*, 16(5), 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006188>
- Voss-Andreae, A., Jonathan Murphy, G. J., Ellacott, K. L., Stuart, R. C., Nillni, E. A., Cone, R. D., & Fan, W. (2006). Role of the Central Melanocortin Circuitry in Adaptive Thermogenesis of Brown Adipose Tissue. *Endocrinology*, 148(4), 1550–1560. <https://doi.org/10.1210/en.2006-1389>
- Wallenius, K., Wallenius, V., Sunter, D., Dickson, S. L., & Jansson, J. O. (2002). Intracerebroventricular interleukin-6 treatment decreases body fat in rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 293(1), 560–565. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)00230-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)00230-9)
- Wallenius, V., Wallenius, K., Ahrén, B., Rudling, M., Carlsten, H., Dickson, S., Ohlsson, C., & Jansson, J. (2002). Interleukin-6-deficient mice develop mature-onset obesity. *Nature Medicine*, 8(1), 75–79.
- Woods, S. C., Kaiyala, K., Porte, D., & Schwartz, M. W. (1997). Food intake and energy balance. In *Diabetes Mellitus* (pp. 175-192). Appleton and Lange Stamford Connecticut. In *Appleton and Lange Stamford Connecticut*.
- Yang, R., Lin, Q., Gao, H. B., & Zhang, P. (2014). Stress-related hormone norepinephrine induces interleukin-6 expression in GES-1 cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 47(2), 101–109. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20133346>
- Zaidi, S., Atrooz, F., Valdez, D., Liu, H., Kochi, C., Bond, R. A., & Salim, S. (2020).

Protective effect of propranolol and nadolol on social defeat-induced behavioral impairments in rats. *Neuroscience Letters*, 725(January).

<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134892>

Zhou, D., Kusnecov, A., Shurin, M. R., DePaoli, M., & Rabin, B. (1993). Exposure to physical and psychological stressors elevates plasma interleukin 6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocrinology*, 133(6), 2523–2530.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Enrique Vázquez Cruz

Candidato para el grado de

Maestría en Ciencias con Orientación en Inmunobiología

Tesis: Papel de la citocina IL-6 en la regulación del peso corporal en ratones de la cepa BALB/c bajo condiciones de estrés crónico

Campo de Estudio: Ciencias Biológicas.

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 4 de septiembre de 1995, hijo de Enrique Vázquez Juárez y Trinidad Cruz Bañuelos.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido: Biólogo en el 2018.

ANEXO I



COMITÉ DE ÉTICA DE INVESTIGACIÓN Y BIENESTAR ANIMAL



RC-07-189
Rev. 0-06/04

No. Registro
CEIBA-2018-024

**Comité de Ética de
Investigación y Bienestar
Animal**

Dr. Moisés Armides
Franco Molina

Presidente

Dr. Diana Caballero
Hernández

Secretario

Vocales

M.C. MVZ. Daniel Julio
Eguíarte Lara

Dr. Gabino Adrián
Rodríguez Almaraz

Dr. Roberto Mercado
Hernández

Miembros Externos

Dr. José González Salinas

Lic. Cinthya Galván Pinelo
(Campaña de adopción y
socorro animal A.C.)

Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas, (CEIBA) de la UANL

Para: Dra. Diana Elia Caballero Hernández

Fecha de aprobación: 14 de junio de 2019

**Título: Papel de la citocina IL-6 en la regulación del peso corporal en
ratones de la cepa BALB/c**

El presente es referencia para el protocolo de investigación mencionado en la
parte superior.

En la deliberación de este comité, los procedimientos de dicha aplicación
conformada por las reglas y el reglamento interno con los temas de uso
animal. La aprobación se otorga durante un año.

Sin más por el momento, le reitero la seguridad de mi más atenta y
distinguida consideración.

San Nicolás de los Garza, Nuevo León, a 15 de junio de 2019

Dr. Moisés Armides Franco Molina
Comité de Ética de Investigación y Bienestar Animal de la Facultad de
Ciencias Biológicas (CEIBA)