

## Original Article

# Actividad del cortisol plasmático en ratas en condiciones de estrés crónico suplementadas con resveratrol

## Plasma cortisol activity in rats under conditions of chronic stress supplemented with resveratrol

Vélez-Marín, Miryam<sup>a</sup>; Hurtado Salazar, Alejandro<sup>b</sup>; Uribe-Velásquez, Luis F<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Caldas, Manizales.

<sup>b</sup>Departamento de Sistemas de Producción, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales.

<sup>c</sup>Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas, Manizales.

Vélez-Marín M, Hurtado A, Uribe-Velásquez Lf. Actividad del cortisol plasmático en ratas en condiciones de estrés crónico suplementadas con resveratrol. *Colomb. Med.* 2012; 43(3) 221- 225

### Article history:

Received : 8 August 2011

Received in revised form

29 september 2011

Accepted : 17 August 2012

Available online 30 september 2012

**Keywords:** Adrenocorticotrophic Hormone, Antioxidants, Phenolic Compounds.

**Palabras clave:** Antioxidantes, Compuestos Fenólicos, Hormona Adrenocorticotrópica.

### Abstract

**Objective:** Determine the activity of cortisol in rats treated with exogenous adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and a resveratrol supplement.

**Methodology:** Forty-eight adult male rats and 16 adult female rats (*Rattus norvegicus*) three months old with a body weight of 200 to 250g and 300 to 350g for both male and female were used and kept in controlled environmental conditions, temperature of 20±2°C and light-dark cycles of 14 and 10 hours. They were fed with balanced food and had free access to water. The rats were randomly divided into four groups: group 1, was treated with 5 µg/kg of ACTH i.p. every twelve hours; group 2, received the same treatment with ACTH plus a grape extract supplementation of 40 mg/kg; group 3, only received grape extract and group 4, served as control and only received saline solution (0.9%) i.p. The experimental was designed as a 2×2 factorial with two ACTH levels and two extract grape levels. **Results:** Significant differences were not found in cortisol concentrations for day, gender or treatment effects (0.75ug/dL ± 0.11; p<0.001).

**Conclusion:** Results suggest that chronic stress and consume of resveratrol did not produce any effect in the activity of plasmatic cortisol, in stressed and unstressed rats stressed. In the same way, possibly, dose of ACTH did not produce stimulation of the suprarenal gland for these animals.

### Resumen

**Objetivo:** Determinar la actividad de cortisol en ratas tratadas con hormona adrecorticotropa (ACTH) exógena y un suplemento de resveratrol.

**Metodología:** Se utilizaron 48 ratas hembras adultas y 16 machos de la cepa wistar (*Rattus norvegicus*) de tres meses de edad y con un peso corporal de 200-250g y 300-350 g, para hembras y machos, respectivamente, que permanecieron en condiciones ambientales controladas, temperatura 20±2°C de ciclos de luz-oscuridad de 14 y 10 horas, respectivamente. Se les proporcionó alimento balanceado con libre acceso a agua. Las ratas fueron divididas en cuatro grupos al azar: grupo 1, fue tratado con 5 µg/kg de ACTH i.p. cada 12 horas; grupo 2, recibió el mismo tratamiento con ACTH además de una suplementación oral de 40 mg/kg de extracto deshidratado de uva (resveratrol); grupo 3, solo recibió extracto de uva y el grupo 4, recibió solución salina y sirvió como control y (0,9%) i.p. y oral. El diseño experimental fue en factorial 2×2, con dos niveles de ACTH y dos niveles de polifenol.

**Resultados:** No se encontraron diferencias significativas del cortisol sanguíneo, con respecto al día y sexo, entre los tratamientos (0,75ug/dL ± 0,11; p<0,001).

**Conclusión:** Los resultados sugieren que el estrés crónico y el consumo de resveratrol no alteran directamente los niveles plasmáticos de cortisol, en ratas estresadas y no estresadas. De la misma manera que, posiblemente la dosis utilizada de ACTH no produjo estimulación de la glándula suprarenal en las ratas.

### Introducción

El término “estrés” fue acuñado por Hans Selye, quien descubrió los estímulos que podían provocar esta condición. Este autor definió el estrés como “la acción de estímulos nerviosos y emocionales provocados por el ambiente sobre los sistemas nervioso, endocri-

no, circulatorio y digestivo de un animal, produciendo cambios medibles en los niveles funcionales de estos sistemas”<sup>1</sup>. Además, señaló que el estrés presenta una relación positiva entre la agresividad del medio externo y la magnitud de la respuesta orgánica del individuo, es decir una reacción de defensa ante los agentes inductores de estrés, que desencadenan respuestas orgánicas capaces de alterar los mecanismos reguladores de la homeostasis. Está bien establecido que las consecuencias fisiológicas y patológicas de la exposición al estrés dependen de las características de la situación estresante, así como de las diferencias individuales<sup>2</sup>. El estrés desencadena alteraciones agudas y crónicas en las concen-

### \*Corresponding Author:

E-mail Address : miryam.velez@ucaldas.edu.co (Vélez-Marín M), lfuribe@ucaldas.edu.co (Uribe-Velásquez LF), alejandro.salazar@ucaldas.edu.co (Hurtado A)

traciones plasmáticas de cortisol y hormonas tiroideas; además, puede acarrear alteraciones en las reacciones fisiológicas y en el comportamiento de los animales<sup>3</sup>.

El cortisol es un corticosteroide producido por la corteza suprarrenal, se sintetiza a partir del colesterol y su secreción es regulada por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) producida en la hipófisis<sup>4</sup>. La medición de los niveles de cortisol en sangre antes y después de la exposición al factor estresante, indica la respuesta individual al estrés biológico<sup>5</sup>. En condiciones de estrés metabólico asociado con factores ambientales y de comportamiento, el eje Hipotálamo Hipófisis Adrenal (HPA) estimula la hipófisis para segregar más ACTH, en comparación con las condiciones normales<sup>6</sup>.

Los polifenoles (PFs) son un grupo heterogéneo de sustancias químicas encontradas en plantas), que se caracterizan por la presencia de un anillo aromático con grupos hidroxilos, incluido esteres y glucósidos<sup>7</sup>. Los PFs son clasificados de acuerdo con el número de carbonos y anillos fenólicos; además del tipo y número de elementos estructurales unidos a la molécula(Ver Tabla 1)<sup>8</sup>. Antiguamente, algunos se consideraban antinutrientes porque tenían la peculiaridad de precipitar macromoléculas como proteínas, carbohidratos y enzimas digestivas, y reducen la digestibilidad de algunos alimentos. Sin embargo, en la década de los noventa aumentó el interés por los PFs por sus posibles efectos beneficiosos sobre la salud. Se propusieron efectos favorables en enfermedades cardiovasculares<sup>9</sup> o neurodegenerativas<sup>10</sup>, en la prevención y tratamiento del cáncer<sup>11</sup> y, en general, en aquellas enfermedades en las que el estrés oxidativo tuviera un papel relevante. Estos efectos beneficiosos se explicaban fundamentalmente por las propiedades antioxidantes, antiinflamatorias<sup>12</sup> y anticancerígenas<sup>13</sup> de los PFs.

Los compuestos polifenólicos de la uva(*Vitis vinífera*) se encuentran en la piel, especialmente en las células epidérmicas y en las semillas, su concentración es baja en la pulpa. La cantidad y calidad de polifenoles en la uva depende de la variedad de la vid, del clima,

del terreno y de las prácticas de cultivo<sup>14</sup>. De los componentes presentes en *Vitis vinífera*, los compuestos fenólicos, especialmente las proantocianidinas han atraído intereses de las farmacéuticas. Estos antioxidantes naturales tienen acciones como secuestradores de radicales libres, mejora la vasodilatación y posee propiedades anticancerígenas, antialérgicas, antiinflamatorias, estimulación inmune. Por último, la actividad estrogénica promueve la inhibición de las enzimas fosfolipasa A2, ciclooxigenasa y lipooxigenasa, y estimula otras como la superóxido dismutasa<sup>15</sup>.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad de cortisol en ratas sometidas a estrés crónico suplementadas con resveratrol.

## Materiales y Métodos

**Localización:** El trabajo experimental se realizó en el Laboratorio de Nutrición y Salud Avícola de la Universidad Caldas, Sede Manizales (Caldas, Colombia).Dicho laboratorio cuenta con jaulas adaptadas para la especie investigada, así mismo los comederos y bebederos. Además, el laboratorio posee ambiente controlado.

**Animales:** Se utilizaron 48 ratas hembras adultas y 16 machos de la cepa wistar (*Rattus norvegicus*) de tres meses de edad y con un peso corporal de 200-250g y 300-350 g, para hembras y machos, respectivamente, que permanecieron en condiciones ambientales controladas, temperatura 20±2°C de ciclos de luz-oscuridadde 14 y 10 horas respectivamente. La salud de los animales fue evaluada por examen clínico antes del período experimental. Los animales fueron distribuidos en cuatro grupos experimentales al azar de 12 hembras y cuatro machos cada uno, que fueron ubicados en cuatro jaulas compuestas cada una por tres hembras y un macho. Cada jaula se tomó como una unidad experimental. Todos los procedimientos de la fase experimental, se llevaron a cabo en relación con la Legislación Colombiana sobre el Cuidado de los Animales (Resolución 8030 de 1993) y aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

**Periodo de adaptación :**Los biomodelos fueron procedentes del Bioterio de la Universidad del Valle, Cali, Colombia. Los animales fueron transportados durante cuatro horas en cajas plásticas de 40 litros (57 cm largo x 37 cm de ancho x 37 cm de altura) a razón de cuatro. Los animales tuvieron un periodo de adaptación de diez días, momento en el cual se conformaron cuatro grupos al azar de 16 ratas (12 hembras y cuatro machos) por tratamiento, distribuidos en cuatro jaulas (tres hembras y un macho, cada una) y se les proporcionó alimento comercial (Rodentina, Agrinal Colombia S.A.) balanceado para ratas (proteína mínima 23,5%; grasa mínima 6,5%; fibra máxima 5% y cenizas máxima 8%), con libre acceso al agua.

**Tratamientos :** Grupo 1, fue tratado con 5 µg/kg de ACTH intraperitoneal (i.p.) (Tetracosactrin acetato; Synacthen, Novartis®, Barcelona, España) cada 12 horas (7:00 a.m. y 7:00 p.m.)durante 30-33 días; grupo 2, recibió el mismo tratamiento con ACTH además de una suplementación oral por gavage de 40 mg/kg de extracto de uva (Resverasor®, Soria Natural S.A. Garray Soria, España); grupo 3, solo recibió extracto de uva 40 mg/kg y grupo 4, sirvió como control y recibieron solución salina (0,9%) i.p. y oral. Las hembras estuvieron separadas del macho por un vidrio, que se retiró 10 días post adaptación, y desde este momento, cada 12

Átomos de Carbono	Esqueleto	Tipo
6	C <sub>6</sub>	Fenoles Simples Benzoquinonas
7	C <sub>6</sub> - C <sub>1</sub>	Ácidos Fenólicos
8	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub>	Derivados de Tirosina Ácidos Fenilacéticos
9	C <sub>6</sub> - C <sub>3</sub>	Ácidos cinámicos Fenilpropenos Cumarinas
10	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>	Naftoquinones
13	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>	Xantonas
14	C <sub>6</sub> - C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Estilbenos
15	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>	Antraquinones Flavonoides Isoflavonoides
18	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Lignanós Neolignanós
30	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>	Bioflavonoides
n9	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	Ligninas
n6	(C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Melaninas Catecólicas
n15	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>	Taninos Condensados

**tabla 1.** clasificación de los principales polifenoles de acuerdo con el número de átomos de carbono del esqueleto base.

horas, se evaluó visualmente la presencia o ausencia de tapón vaginal cada para determinar la cópula, que fue tomado como día 0 de gestación.

**Toma de muestras y análisis del cortisol:** Para la medición del cortisol plasmático, se tomaron 2 muestras de sangre en horas de la mañana (7:00 a.m.) antes del tratamiento (día 0) y después del tratamiento (día 30-33 y 23), momento en que los animales fueron sacrificados, para hembras y machos respectivamente. Las muestras sanguíneas fueron tomadas por ruptura del plexo venoso de la órbita ocular (1 mL) con un capilar heparinizado, con el animal anestesiado por poco tiempo con éter dietílico. Al final del periodo experimental, la muestra de sangre fue obtenida por punción cardiaca, inmediatamente después del sacrificio. Posteriormente, la sangre fue puesta en tubos vacutainer, centrifugada a  $1300 \times g$  durante 5 minutos y el plasma obtenido (0,2 mL) se guardó en alícuotas en condiciones de congelación a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hasta su procesamiento. La concentración sanguínea de cortisol ( $\mu\text{g/dL}$ ) se determinó con la técnica de electroquimio luminiscencia (Advia Centauro de Siemens), que consiste en reacciones químicas en las que un precursor quimioluminiscente es tratado con sustancias oxidantes y catalizadores para producir un producto intermedio que, excitado electrónicamente produce radiaciones electromagnéticas en un espectro de fotones, visible. La sensibilidad analítica fue de  $0,018\text{ }\mu\text{g/dl}$  y una sensibilidad funcional de  $0,07\text{ }\mu\text{g/dl}$ . La medición se realizó en el Laboratorio clínico, Comfamiliares, Manizales, Caldas. Las muestras fueron tomadas a una hembra y a un macho por jaula (unidad experimental), de cada uno de los tratamientos. La medición se realizó en el Laboratorio Clínico, Comfamiliares, Manizales, Caldas.

**Diseño experimental y análisis estadístico:** El diseño fue completamente experimental, al azar balanceado y completo, con una asignación de los tratamientos en un arreglo factorial  $2 \times 2$ , con dos niveles de ACTH (ausencia y presencia) y dos niveles de polifenol (ausencia y presencia); con cuatro réplicas. La unidad experimental estaba conformada por una jaula con tres hembras y un macho. Mediante análisis de varianza se evaluó el efecto del ACTH y polifenol y su interacción lineal sobre cortisol. También se evaluó el efecto día sobre la concentración de cortisol.

### Resultados y discusión

A partir de los resultados obtenidos, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones del cortisol, con respecto al día y tratamiento ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2).

Ulrich-Lai y colaboradores, han descrito la regulación positiva de ACTH sobre la producción de glucocorticoides por la adrenal en ratas<sup>16</sup>. La ACTH estimula la secreción de glucocorticoides y eleva los niveles intracelulares de AMPc, lo que induce rápidamente un aumento en la actividad de la enzima Steroidogenic Acute Regulatory (StAR), incrementa la entrada de colesterol a la mitocondria. Por otro lado, la ACTH aumenta la actividad de otras enzimas como las citocromo P450, involucradas en la síntesis de glucocorticoides y contribuye a un aumento neto de su producción. Los niveles plasmáticos de glucocorticoides actúan directamente sobre la hipófisis o sobre neuronas del hipotálamo y ejercen una retroalimentación negativa sobre su secreción, protege al organismo de los efectos del hipercortisolismo<sup>17</sup>.

Cortisol ( $\mu\text{g/dl}$ ) <sup>*</sup>	G1	G2	G3	G4
Día -11	0,43±0,22	0,43±0,41	0,48±0,22	0,57±0,22
Día 11	0,72±0,21	1,06±0,20	0,89±0,22	0,22±0,25

**tabla 2.** concentraciones plasmáticas de cortisol en los diferentes tratamientos en ratas sometidas a estrés crónico. G1: ACTH, G2: ACTH+resveratrol, G3: resveratrol G4: control. No hubo diferencias significativas entre tratamientos o días.

Los glucocorticoides circulantes, presentan ritmos circadianos que se caracterizan por una máxima actividad en las primeras horas del día para los animales diurnos, incluido el hombre y al anochecer en animales nocturnos<sup>18</sup>. El ritmo puede ser endógeno o exógeno, según sea o no generado por el propio organismo, aunque se ha reportado que sólo se consideran ritmo cuando es endógeno<sup>19</sup>. Los ritmos endógenos son producidos por un reloj biológico, que en los mamíferos se encuentra situado en el núcleo supraquiasmático del hipotálamo. Debido a su origen endógeno, estos ritmos se expresan aun ante la ausencia de ciclos externos ambientales. De acuerdo con su frecuencia, se clasifican como ritmos circadianos aquellos que tienen una frecuencia próxima a un día, es decir entre 22 y 28 horas. Sin embargo, es preciso mencionar que superpuestos a los ritmos circadianos, se encuentran los ritmos de mayor frecuencia, denominados ultradianos, que corresponden a la secreción pulsátil de algunas hormonas (cada 2 horas), como se observa con el cortisol, que además del ritmo ultradiano, sigue un ritmo circadiano de 24 horas aproximadamente<sup>19</sup>.

En hamsters, lesiones del núcleo supraquiasmático suprimen el ritmo circadiano de cortisol y corticosterona (ambos esteroides son sintetizados por la corteza adrenal en esta especie), lo que genera una alta dispersión de los valores plasmáticos de estas hormonas<sup>20</sup>. Este conjunto de resultados sugiere que, el ritmo circadiano de secreción de glucocorticoides por la corteza adrenal, está regulado no sólo por el control del núcleo supraquiasmático sobre los niveles plasmáticos de ACTH, sino también por una vía de innervación directa demostrada por Buijs y cols.<sup>20</sup> Sin embargo, estos resultados no excluyen una capacidad intrínseca de la corteza adrenal para producir funciones rítmicas.

Tanto el ritmo circadiano de glucocorticoides como la sensibilidad de la respuesta de la corteza adrenal a ACTH dependen del núcleo supraquiasmático. En ratas tratadas con dexametasona, previamente lesionadas el sistema nervioso central por electrocoagulación, tratamiento que inhibe la ACTH endógena, indicó cambios en la sensibilidad de la glándula adrenal. Sin embargo, en las ratas tratadas con dexametasona, se observaron diferencias en la magnitud de la respuesta a ACTH cuando los animales se agruparon según la concentración basal de corticosterona (38 a 373 ng/ml), lo que podría implicar que, la glándula adrenal mantiene su capacidad intrínseca de responder diferencialmente a ACTH<sup>21</sup>. Según algunos autores<sup>22</sup>, contrario a lo reportado por Ulrich-Lai y cols.<sup>16</sup>, en ratas con el núcleo supraquiasmático intacto, la diferencia mañana/tarde de sensibilidad a ACTH desaparece cuando se denerva la glándula adrenal.

Al tener en cuenta lo anterior, la hora del día en la que se toman las muestras de sangre para la medición del cortisol, puede ser un factor fundamental, debido al ritmo circadiano que presenta la hormona. A diferencia de lo encontrado en otras investigaciones realizadas, en las que no se especifican el momento en el que

se tomó la muestra, en el presente estudio esto no fue un factor de variación de los resultados obtenidos por Radahmadi y cols.<sup>23</sup> reportaron que, los niveles de cortisol determinados 14 días después de generado el estrés en ratas (diabéticas con y sin estrés y no diabéticas con y sin estrés), no presentan alteraciones, puesto que la adrenal puede adaptarse al estímulo que produce el estrés. Así que, cuando existe un agente estresor repetido, la glándula suprarrenal no puede responder debido posiblemente a la adaptación al estrés físico.

Se cree que los glucocorticoides son cruciales para respuestas, al inicio y al final del estrés. Parece ser que el papel de los receptores de los glucocorticoides se ejerce en la última fase de respuesta, y da como resultado la recuperación desde la situación de estrés inicial a un estado normal del organismo. En esta última fase, se produce almacenamiento en la memoria de lo sucedido, lo que permite preparar el organismo a nuevas situaciones similares de emergencia. Además, se movilizan recursos energéticos, se prepara para futuros acontecimientos, restituyen, además, la homeostasis alterada previamente en la fase inicial por la salida de glucocorticoides<sup>24</sup>. Por lo tanto, el estrés crónico puede causar un incremento en la secreción de ACTH que se compensa por la retroalimentación cortical negativa y la memoria almacenada posiblemente generada por las experiencias previas.

El estrés crónico aumenta el estrés oxidativo a través del aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno<sup>25</sup>. En animales sometidos a condiciones de estrés oxidativo, los diferentes sistemas biológicos atacados emiten a través de los nervios simpáticos una señal de alerta que se transforma por medio de una serie de etapas metabólicas y endocrinas en glucocorticoides<sup>26</sup>. Los antioxidantes tienen como fin disminuir el efecto tóxico y controlar el origen de las patologías causadas por el estrés oxidativo. Por lo tanto, al enfrentar el estrés oxidativo con un producto antioxidante como el resveratrol, los niveles de glucocorticoides posiblemente deben disminuir. Debido a que las ratas llegaron a la etapa de resistencia al estrés, es decir, que los animales afrontaron la presencia del factor amenazante, con ACTH, posiblemente a la acción del antioxidante y es en esta etapa donde participa el eje hipotálamo-hipófisis y la corteza adrenal, ocurriendo una normalización de los niveles de glucocorticoides.

La aplicación de ACTH cada 12 horas no produjo cambios en las concentraciones plasmáticas de cortisol entre los cuatro grupos tratados; sin embargo la manipulación de los animales puede crear una adaptación suprarrenal, razón por la cual probablemente no se observaron cambios en la concentración de cortisol plasmático.

### Conclusión

Los resultados sugieren que el estrés crónico inducido por ACTH y el consumo de resveratrol no alteran directamente los niveles plasmáticos de cortisol en ratas tratadas y no tratadas. De la misma manera, la dosis utilizada de ACTH no produjo estimulación de la glándula adrenal en las ratas.

### Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigaciones y Posgrados (VIP) de la Universidad de Caldas, Manizales Colombia; por la financiación para la ejecución de la presente investigación.

### Conflicto de intereses

Declaramos no tener conflicto de intereses con la Universidad de Caldas quien patrocinó la investigación.

### Referencias

- Selye H. The evolution of the stress concept. *Am Sci*. 1973;61(6):692-699.
- Nadal R AA. Mecanismos de susceptibilidad al estrés. *Hipertensión y Riesgo Vascular*. 2010;27:117- 124.
- Vélez-Marín M U-VL. ¿Cómo afecta el estrés calórico la reproducción? *Biosalud9(2)\_9.pdf* (objeto application/pdf). 2010; [http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Biosalud9\(2\)\\_9.pdf](http://biosalud.ucaldas.edu.co/downloads/Biosalud9(2)_9.pdf).
- Miller DB, O'Callaghan JP. Neuroendocrine aspects of the response to stress. *Elsevier Metabolism* 2002 (51): 5-10. Vol 51. Science 5. Fauvel JP, Quelin P, Ducher M, Rakotomalala H, Laville M. Perceived job stress but not individual cardiovascular reactivity to stress is related to higher blood pressure at work. *Hypertension*. 2001;38(1):71-75.
- Matteri RL CJ, Dyer CJ. Neuroendocrine responses to stress chap3.pdf (objeto application/pdf). 2001; <http://www.depts.ttu.edu/animalwelfare/classes/ANSC%205318/Measuring%20download/Neuroendocrine%20responses%20to%20stress%20chap3.pdf>.
- D'Archivio M, Filesi C, Di Benedetto R, Gargiulo R, Giovannini C, Masella R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. *Ann Ist Super Sanita*. 2007;43(4):348-361.
- Leighton F UI. Polifenoles del vino y salud humana. *Antioxidantes y Calidad de Vida*. 2000;7:5-13.
- Hall SS. Longevity research. In vino vitalis? Compounds activate life-extending genes. *Science*. Vol 301. 2003:1165.
- Sun AY, Simonyi A, Sun GY. The "French Paradox" and beyond: neuroprotective effects of polyphenols. *Free Radic Biol Med*. Vol 32. 2002:314-318.
- Lambert JD, Hong J, Yang GY, Liao J, Yang CS. Inhibition of carcinogenesis by polyphenols: evidence from laboratory investigations. *Am J Clin Nutr*. Vol 81. 2005:284S-291S.
- Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, et al. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci*(8):4524-4529.
- Yang CS, Landau JM, Huang MT, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary polyphenolic compounds. *Annu Rev Nutr*. Vol 21. 1:381-406.
- R. I. Polifenoles del vino y oxidabilidad de las lipoproteínas ¿Blanco o tinto? *Clín Inves Arteriosclerosis*. 1997;9(1):19-22.
- Santangelo C, Vari R, Scaccocchio B, Di Benedetto R, Filesi C, Masella R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita*. 2007;43(4):394-405.
- Ulrich-Lai YM, Arnhold MM, Engeland WC. Adrenal splanchnic innervation contributes to the diurnal rhythm of plasma corticosterone in rats by modulating adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Vol 290. 2006:R1128-1135.
- Arlt W, Stewart PM. Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. *Endocrinol Metab Clin North Am*. Vol 34. 2005:293-313, viii.
- Torres-Farfan C, Richter HG, Germain AM, et al. Maternal melatonin selectively inhibits cortisol production in the primate fetal adrenal gland. *J Physiol*. Vol 554. 2004:841-856.
- Angeles-Castellanos M RK, Salgado R, Escobar C. Cronobiología médica: Fisiología y fisiopatología de los ritmos biológicos.

Rev Fac Med Univ Nac Auton Mex. 2007;50:235-241.

20. Buijs RM, Wortel J, Van Heerikhuize JJ, et al. Anatomical and functional demonstration of a multisynaptic suprachiasmatic nucleus adrenal (cortex) pathway. *Eur J Neurosci.* 11(5):1535-1544.

21. Sage D, Maurel D, Bosler O. Corticosterone-dependent driving influence of the suprachiasmatic nucleus on adrenal sensitivity to ACTH. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 282(2):E458-465.

22. Dijkstra I, Binnekade R, Tilders FJ. Diurnal variation in resting levels of corticosterone is not mediated by variation in adrenal responsiveness to adrenocorticotropin but involves splanchnic nerve integrity. *Endocrinology.* 137(2):540-547.

23. Radahmadi M, Shadan F, Karimian SM, Sadr SS, Nasimi A. Effects of stress on exacerbation of diabetes mellitus, serum glucose and cortisol levels and body weight in rats. *Pathophysiology.* Vol 13 :51-55.

24. Pascual-Leoné Pascual AM, Pascual AMP-L. Acciones cerebrales de los esteroides: estado actual de la respuesta al estrés e implicaciones en la conducta. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia.* 17/03/2010 2010;0(0).

25. Tsigos C, Chrousos GP. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res.* Vol 53. 2002:865-871.

26. Hatamoto LK, Baptista Sobrinho CA, Nichi M, Barnabe VH, Barnabe RC, Cortada CN. Effects of dexamethasone treatment (to mimic stress) and Vitamin E oral supplementation on the spermogram and on seminal plasma spontaneous lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in dogs. *Theriogenology.* Vol 66. 2006:1610-1614.