Efecto del estrés crónico y de la masticación sobre los niveles séricos de interleuquina-6 e interferón-gama.

Effect of chronic stress and chewing on serum interleukin-6 and interferon-gamma levels.

Aguirre-Siancas Elías Ernesto[1,4], Alzamora-Gonzales Libertad[1,3], Colona-Vallejos Erasmo[1,3], Arone-Farfán Ricardo[3], Ruiz-Ramírez Eliberto[1,4], Portilla-Flores Oscar Sigifredo[1], Becerra-Bravo Melissa Aracely[1], Tinoco-Valerio Daniel Jhonatan[1], Condori-Macuri Rosa María[3], Alarcón-Velásquez Lucero[1], Lam-Figueroa Nelly Maritza[1,2]

ABSTRACT

Introduction: *chronic stress affects the immune balance by altering the serum levels of interleukin-6 (IL-6) and gamma interferon (INF-γ), this alteration affects the nervous system and human behavior. Appropriate chewing would lessen these effects. The aim of this study was to determine the effect of chewing and chronic stress over serum levels of IL-6 and INF-γ.* ***Methods:*** *experiment in which 64 Balb/C mice of 8 weeks of age were used, they were divided into 4 treatments: Group NE: Normal chewing + stress, Group N: normal chewing without stress, Group DE: Chewing poor + stress, Group D: poor chewing without stress. IL-6 and IFN-γ were measured by ELISA after 4 and 8 weeks of treatment. Results: both IL-6 and IFN-γ were higher in the DE group (p <0,05) at the end of fourth week of treatment. When evaluating the animals at the end of the eighth week of treatment, it was observed that in the NE group, the IL-6 was increased with respect to the rest (p <0,0001) and the DE group showed more IFN-γ (p <0,0001).* ***Conclusion:*** *stress and poor chewing increase serum IL-6 and IFN-γ. In contrast, appropriate chewing decreases the effects of stress on the increase of such cytokines at the end of the fourth week of treatment in animals.*

Key words: *Chewing, chronic stress, experimental neurosciences, IL-6, INF-γ.*
Rev. Chil Neuro-Psiquiat 2022; 60 (4); 394-402

Recibido: 27-07-2021
Aceptado: 22-08-2022

Conflicto de intereses: los autores declaran que no existen conflictos de intereses en el presente trabajo.
Financiamiento: el presente estudio fue financiando por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

1 Grupo de Investigación NEURON. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
2 Instituto de Investigaciones Clínicas. Facultad de Medicina. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
3 Facultad de Biología, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
4 Universidad Científica del Sur, Lima, Perú.

INTRODUCCIÓN

Walter Cannon describió por primera vez el estrés y el concepto de homeostasis en 1915, luego Hans Selye investigaba "la respuesta fisiológica al estrés" (1936) definiéndolo como una reacción de alarma. En aquel tiempo el estrés tenía un valor más estático, debido a que no se conocía a profundidad el dinamismo permanente de los procesos fisiológicos y la adaptación dentro de un contexto específico[1,2]. Un agente estresor tiene como características la frecuencia y la duración de su aplicación; siendo crónico si esta situación se mantiene en el tiempo[3,4]. Investigaciones acerca de la biología del estrés crónico, involucran diversas familias de citoquinas entre las que se destacan a la IL-6 y los interferones (IFN), los cuales se han estudiado con mayor frecuencia como marcadores de la interfaz entre la psicología y la biología[5,7]. Ello debido a que dichas citocinas se asocian a estímulos psicosociales, influyendo en el comportamiento y en los estados psicológicos; originando cambios en los procesos biológicos dentro del sistema nervioso y que se manifiestan con reacciones biopsicológicas como la ansiedad.[5-8]

Se reconoce que el estrés crónico, debido a las alteraciones inmunes que produce, aumenta la expresión de ciertas citoquinas incrementando la susceptibilidad a infecciones, cáncer y alteraciones cognitivas, además puede exacerbar afecciones alérgicas o autoinmunes debido al desequilibrio que origina en las citoquinas circulantes[9-11]. Himmerich et al.[11], encontraron en roedores sometidos a estrés por inmovilización aumento en los niveles de IL-6 y disminución en la producción de INF-γ comparado con ratas que no fueron estresadas. Ellos concluyeron que el incremento de la IL-6 indicaría una ruta fisiopatológica que se inicia con el estrés agudo y prosigue con el estrés crónico hasta el desarrollo de depresión, alteraciones cognitivas, trastornos autoinmunes, alergias y cáncer; además, que la disminución en la INF-γ explicaría la mayor susceptibilidad a la infección observada en los períodos de vida asociados con niveles sostenidos de estrés.

Por otro lado, se ha encontrado que la IL-6, y otros miembros de dicha familia de citoquinas, poseerían funciones no solamente proinflamatorias sino también antiinflamatorias[12]. Pagliarone et al.[13] reportaron el hallazgo de inhibición en la producción de IFN-γ en ratones sometidos a estrés. Lo cual Li et al.[14] lo relacionaron con el aumento del cortisol debido a los estímulos estresantes, encontrando que el incremento del cortisol disminuye los niveles séricos de IFN-γ y permite la aparición de autoinmunidad y enfermedades infecciosas. Además, ha sido reportado que el incremento de las catecolaminas circulantes, debido al estrés, también inhibe la liberación del IFN-γ.[7,11]

En general, la masticación es conocida como el primer proceso dentro de la función digestiva; sin embargo, actualmente se empieza a comprender que la función masticatoria también tendría funciones regulatorias sobre el sistema nervioso y sobre el sistema inmune[15,17]. En los seres humanos, morderse las uñas, apretar los dientes y morder objetos se consideran como respuestas ante el estrés; así se sabe que el masticar o el morder atenúan las enfermedades inducidas por el estrés como: úlceras gástricas, problemas cognitivos y alteraciones psicológicas[15]. Encontrándose en diversas investigaciones en roedores, a los cuales se les estimuló la función masticatoria, disminución de los efectos del estrés sobre el eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal y sobre la actividad reactiva del sistema nervioso autónomo, atenuándose la secreción y como consecuencia los niveles plasmáticos de corticoesteroides[15,18]. Además, se ha reportado que el estrés inducido en roedores sin estímulo masticatorio aumentó los niveles séricos de IL–6; por el contrario, el adecuado estímulo masticatorio disminuyó los niveles de dicha citoquina, así como del IL-1α y del l IL-1β.[19]

Debido a la importancia que el estrés y las citoquinas tienen sobre la fisiología y la fisiopatología, destacándose su efecto sobre el sistema nervioso y el comportamiento humano, y siendo aún poco estudiado y claro el rol que

tiene la masticación sobre la expresión sérica de las citoquinas durante el estrés; el presente trabajo abordó dichas variables teniendo como hipótesis que la masticación disminuye los efectos del estrés crónico sobre las concentraciones séricas de IL-6 e INF-γ en ratones de la cepa Balb/c.

MÉTODOS

Animales

El estudio experimental fue aprobado por el Vicerrectorado de Investigación de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM), donde se empleó 64 ratones albinos machos de 8 semanas de edad de la cepa Balb/c (Instituto Nacional de Salud de la ciudad de Lima, Perú) con pesos entre 25 a 30 g. Luego de adquiridos, los animales fueron ambientados durante una semana en el bioterio de la Facultad de Medicina de la UNMSM donde se alimentaron ad libitum con la misma dieta en granos (convencional para ratón) que recibieron desde el destete y con ciclos de luz y oscuridad alternados de 12 horas y con humedad y temperatura controlada, de acuerdo con la Guide for the Care and Use of Laboratory Animal.[20]

Procedimientos

Luego de la semana de ambientación en el bioterio los ratones fueron distribuidos de manera aleatoria en 4 grupos iguales, aplicándoseles los siguientes tratamientos:

Grupo NE: Masticación normal + estrés por inmovilización, que continuó con la misma dieta en granos y se le aplicó estrés por inmovilización.

Grupo N: Masticación normal sin estrés, continuó con la misma dieta en granos y no se le aplicó estrés por inmovilización.

Grupo DE: Masticación deficiente + estrés por inmovilización, se alimentó con granos pulverizados (dieta en polvo) para inducir deficiencia masticatoria y se le aplicó estrés por inmovilización.

Grupo D: Masticación deficiente sin estrés, se alimentó con granos pulverizados (dieta en polvo) para inducir deficiencia masticatoria y no se le aplicó estrés por inmovilización.

Paradigma para inducción del estrés por inmovilización: después de la semana de ambientación, los grupos NE y DE fueron inducidos a estrés por inmovilización para lo cual se colocó al roedor en una caja de restricción de poliestireno transparente para mantenerlo inmóvil, de acuerdo con el diseño de Lam-Figueroa et al[21]. Dicho procedimiento se realizó una sola vez al día entre las 08:00 y 12:00 horas por el tiempo de 60 minutos durante toda la investigación.

Paradigma para variar el tipo de masticación: todos los animales recibieron la misma dieta en granos (convencional para ratón) desde el destete. Luego de la semana de ambientación los grupos N y NE continuaron con su misma dieta, mientras a los grupos D y DE se les cambio a una dieta en polvo, para lo cual se pulverizaron los granos. Dicho diseño permite modificar el tipo de masticación variando la consistencia de la dieta.[22]

Cuantificación de IL-6 e IFN-γ: para el análisis de las citoquinas, ocho ratones de cada uno de los 4 grupos experimentales se sacrificaron mediante dislocación cervical[23] al final de la cuarta semana de tratamiento, haciéndose lo propio con la otra mitad de la muestra al término de la octava semana de tratamiento. Para el análisis se colectó la sangre de los ratones por punción cardiaca en tubos Minicollect® Z serum mediante el empleo de una jeringa de 1 ml 25Gx5/8 marca Segurimaxx® estériles. La muestra se incubó a 37°C durante 30 minutos y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente. El suero se conservó a -80°C hasta su análisis. Para la cuantificación de las citoquinas se emplearon kits de ELISA sándwich para IL-6 e IFN-γ (Invitrogen®, 88706488 y 88831488 respectivamente) y se procedió de acuerdo con las instrucciones de manufactura. La concentración de citoquinas en las muestras de suero de los ratones tratados en

los 4 grupos experimentales se calculó utilizando regresión polinómica de orden 2 mediante el lector de ELISA (Sinowa® ER500) a D.O450 y D.O630.

Análisis e interpretación de la información: el análisis y la interpretación de los datos se realizó empleando el software Graphpad Prisma versión 5.0 para Windows. Se hizo primero la estadística descriptiva donde se agruparon los datos de acuerdo con sus medias y desviación estándar. Luego se aplicó la estadística inferencial, donde al determinarse que las variables seguían una distribución normal de acuerdo con la prueba de Shapiro-Wilk y tenían homocedasticidad de acuerdo con la prueba de Levene, se empleó el análisis de varianza y la prueba de Tukey. Se considero una significancia de 0,05.

RESULTADOS

Se evaluaron los cuatro grupos experimentales de ratones Balb/c al terminar la 4ta y 8va semana de tratamiento. En la **tabla 1** se muestras las medias ± desviación estándar encontradas en el suero para IL-6 e IFN-γ.

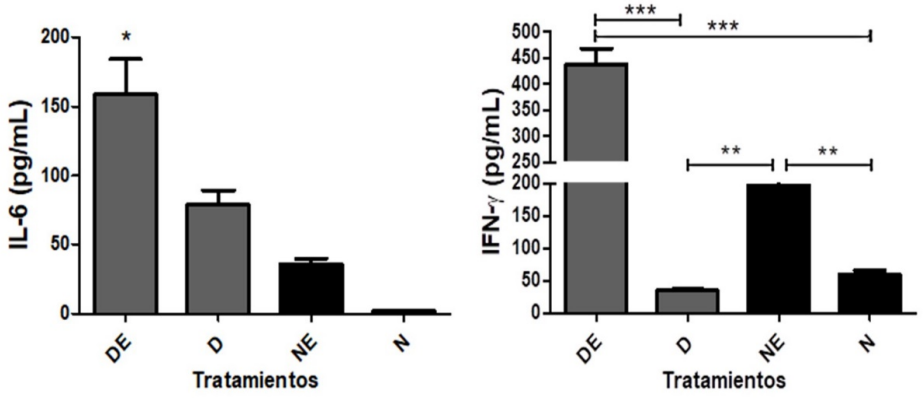
En el control realizado al término de la 4ta semana de tratamiento se encontró que los ratones del grupo DE aumentaron la producción de IL-6 respecto de los demás grupos ($p<0,05$), mientras que el tratamiento NE no produjo resultados

Tabla 1. Efecto del estrés crónico y de la masticación en los niveles séricos de IL-6 e IFN-γ en los cuatro grupos experimentales.

Evaluaciones	Grupo Experimental	IL 6 (pg/ml)	INF γ (pg/ml)
4ta semana	N	1,69 ± 0,90	59,63 ± 9,97
	NE	35,59 ± 7,12	197,05 ± 13,02
	D	78,69 ± 18, 61	35,39 ± 2,10
	DE	158,52 ± 44, 54	437,53 ± 53,28
8va semana	N	-3,57 ± 1,97*	22,34 ± 2,31
	NE	23,63 ± 4,61	182,70 ± 68,73
	D	-6,51 ± 1,79*	62,31 ± 2,69
	DE	-3,15 ± 0,09*	487,42 ± 59,29

*Los valores negativos corresponden a la concentración de la muestra por debajo del extremo inferior de la curva estándar de las citoquinas evaluadas. **Tratamientos**: **DE**, masticación deficiente + estrés; **D**, masticación deficiente; **NE**, masticación + estrés; **N**, masticación normal.

Figura 1. Efecto del estrés crónico y de la masticación en la producción sérica de las citoquinas evaluadas al término de la 4ta semana de tratamiento.



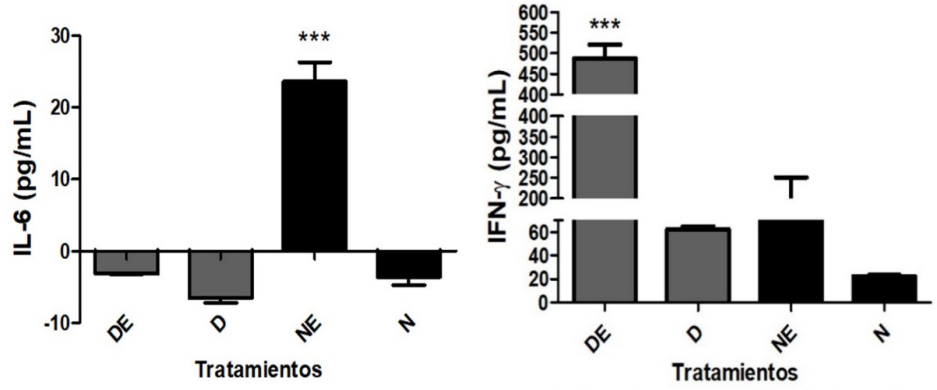
A **B**

A: Niveles séricos de IL-6. **B**: Niveles séricos de IFN-γ. **Tratamientos**: **DE**, masticación deficiente + estrés; **D**, masticación deficiente; **NE**, masticación + estrés; **N**, masticación normal. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,0001

significativos respecto a su control N. Con relación al IFN-γ los ratones de los grupos DE y NE incrementaron su producción comparados con D y N (p<0,0001) y (p<0,01) respectivamente, como se observa en la **Figura 1A y 1B**.

En el control realizado al final de la semana 8 de tratamiento se observó incremento en la producción de IL-6 en los ratones del grupo NE respecto a los demás grupos (p<0,0001), mientras que el tratamiento DE no mostró diferencia significativa comparado con D. El IFN-γ aumentó significativamente en el tratamiento DE frente a los demás grupos (p<0,0001); por el contrario, el tratamiento NE no produjo diferencia significativa respecto a su control N, como se observa en la **Figura 2A y 2B**.

Figura 2. Efecto del estrés crónico y de la masticación en la producción sérica de las citoquinas evaluadas al término de la 8va semana de tratamiento.



A **B**

A: Niveles séricos de IL-6. **B**: Niveles séricos de IFN-γ. **Tratamientos**: **DE**, masticación deficiente + estrés; **D**, masticación deficiente; **NE**, masticación + estrés; **N**, masticación normal. ***p<0,0001

DISCUSIÓN

En la presente investigación se determinó el efecto del estrés crónico y de la masticación sobre los niveles séricos de IL-6 e INF-γ. Se emplearon 4 grupos de 16 ratones cada uno. Dos grupos fueron sometidos a estrés, uno tuvo adicionalmente masticación deficiente (DE), mientras que el otro tuvo masticación normal (NE). En los otros 2 grupos solamente se modificó la masticación, siendo un grupo con masticación normal (N) y el otro con masticación deficiente (D). Para cuantificar las citoquinas mediante el test de ELISA se sacrificó a la mitad de los integrantes de cada grupo experimental a la cuarta semana, y la otra mitad a la octava semana de iniciado del experimento.

En los tratamientos sometidos a estrés, se observó que en los ratones del grupo DE se incrementó significativamente la producción de IL-6 e IFN-γ al término de la semana 4 de tratamiento, y de IFN-γ al final de la semana 8 de tratamiento respecto al resto de grupos evaluados. Además, al término de la 4ta semana se encontró en el grupo NE incremento de IFN-γ comparado con los tratamientos N y D; además, en dicho grupo hubo aumento significativo de IL-6 al término de la 8va semana respecto a los demás grupos evaluados. Los resultados obtenidos concuerdan con los de Voorhees et al.[24], y de Himmerich et al.[11], quienes determinaron que el estrés prolongado, inducido por restricción de movimiento en ratones, incrementa la IL-6. Cheng et al.[25], demostraron que ratones estresados doblemente por choques eléctricos en las patas aceleran el incremento de los niveles de IL-6 respecto a los ratones estresados una sola vez con dicho modelo. También se ha comprobado que ratones expuestos a estrés agudo inducido por radiación incrementaron significativamente sus niveles de IL-6 e IFN-γ[26]. En otras investigaciones se ha encontrado que la inducción de estrés crónico en roedores les produce conductas depresivas e incremento de las citoquinas IL-6 y TNF-α[25-29]. Además, se ha reportado que el impacto de encuentros agresivos estresantes llega a aumentar, en los ratones, los niveles plasmáticos de IL-6[29]. Todos los estudios referenciados coinciden con lo encontrado en el presente trabajo respecto al incremento de IL 6 en los grupos sometidos a estrés (NE y DE). Aunque es adecuado indicar que en el estudio de Rong et al.[26], se evaluó estrés agudo y nosotros trabajamos un modelo de estrés crónico; sin embargo, lo que se observa es que el estrés, independientemente de la duración de este, incrementó la expresión sérica de IL-6.

Los resultados del trabajo demuestran que en el estrés crónico y la masticación deficiente incrementan la producción de IL-6 e IFN-γ al final de la cuarta y octava de tratamiento a diferencia de los animales bajo masticación normal y sin estrés (grupo N). El estrés crónico activa el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal y el eje simpático – adrenal - medular que secretan glucocorticoides y catecolaminas los cuales aumentan la secreción de citoquinas proinflamatorias[30]. Wang et al.[31], demostraron que ratones inducidos a estrés por inmovilidad incrementaron significativamente la producción de IL-6, lo cual se relaciona con la hiperactividad del eje. Assaf et al.[32], demostraron diferencias en la producción de IFN-γ en personas sometidas a estrés académico; así, en la etapa inicial y la etapa media del semestre académico se observó incrementó significativo de IFN-γ, mientras que al final del semestre disminuyó el IFN-γ.

Los investigadores concluyeron que la disminución en la producción de dicha citoquina, al final del semestre de estudios, se relacionó con el incremento del cortisol en dicha etapa al conllevar mayor estrés en el estudiante; sin embargo, en nuestro trabajo los grupos sometidos a estrés crónico (NE y DE) tuvieron altos niveles séricos de IFN-γ tanto en la cuarta como en la octava semana de evaluación. Dicho hallazgo podría implicar un comportamiento diferente en los roedores con respecto a los humanos referente a la concentración de dicha citoquina. Sería recomendable seguir profundizando el estudio sobre la IFN-γ dado el importante rol que cumple dicha molécula en la fisiología y fisiopatología humana, además de poder estudiar el comportamiento de las citoquinas trabajadas en el presente estudio en

condiciones en las que aún no han sido evaluadas, tales como: en masticación y estrés agudo o en masticación y estrés intermitente, dado el importante rol que al parecer cumpliría la función masticatoria en la modulación del estrés, y que lamentablemente, sobre todo en Latinoamérica, aun las políticas públicas no priorizan el mantenimiento y la oportuna rehabilitación de dicha función, lo cual no solamente repercutiría en su rol digestivo sino, sobre todo, en su rol modulador de diversas funciones en el sistema nervioso y en el sistema inmune.

En conclusión, el estrés crónico asociado a la masticación deficiente incrementó los niveles de IL-6 e IFN-γ en los ratones Balb/c. En cambio, se puede entender algún rol protector de la masticación adecuada al no incrementarse el nivel de IL-6 en la misma magnitud en el grupo NE al compararlo con el DE al final de la semana 4 de evaluación; sin embargo, dicho rol protector ya no se observa al término de la semana 8, lo cual nos permite entender que el estrés sobrepasa, en el tiempo, los efectos benéficos que tendría la masticación.

RESUMEN:

Introducción: *el estrés crónico afecta el equilibrio inmunológico alterando los niveles séricos de interleuquina-6 (IL-6) e interferón gama (INF-γ), dicha alteración afecta al sistema nervioso y al comportamiento humano. La masticación adecuada disminuiría dichos efectos. El objetivo del estudio fue determinar el efecto del estrés crónico y de la masticación sobre los niveles séricos de IL-6 e INF-γ.* ***Métodos:*** *experimento donde se emplearon 64 ratones Balb/c de 8 semanas de edad. Se dividieron en 4 tratamientos: Grupo NE: Masticación normal + estrés, Grupo N: masticación normal sin estrés, Grupo DE: Masticación deficiente + estrés, Grupo D: masticación deficiente sin estrés. Mediante test de ELISA se midió IL-6 e IFN-γ al final de la 4ta y de la 8va semana de tratamiento. Resultados: tanto la IL-6 como el IFN-γ fueron mayores en el grupo DE ($p<0,05$) al final de la 4ta semana. Al evaluarlos al término de la 8va semana se observó que en el grupo NE se incrementó la IL-6 respecto al resto de grupos ($p<0,0001$), y en el grupo DE fue donde se encontró mayor cantidad de IFN-γ ($p<0,0001$).* ***Conclusión:*** *el estrés crónico y la masticación deficiente incrementan los niveles séricos de IL-6 e IFN-γ. En cambio, la adecuada masticación disminuye el nivel de tales citoquinas al final de la cuarta semana de tratamiento.*

Palabras clave: *estrés crónico, IL-6, INF-γ, masticación, neurociencias experimentales.*

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Tan SY, Yip A. Hans Selye (1907-1982): Founder of the stress theory. Singapore Med J. 2018;59(4):170-171. DOI:10.11622/smedj.2018043
2. McEwen & Wingfield. The concept of allostasis in biology and biomedicine. Horm Behav. 2003; 43: 2-15. DOI: 10.1016/s0018-506x(02)00024-7
3. Peters A, McEwen BS, Friston K. Uncertainty and stress: Why it causes diseases and how it is mastered by the brain. Prog Neurobiol. 2017; 156: 164-188. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2017.05.004.
4. Stults-Kolehmainen M, Sinha R. The Effects of Stress on Physical Activity and Exercise Sports Med. 2014; 44: 81–121. doi:10.1007/s40279-013-0090-5.
5. Ganança L, Oquendo M, Tyrka A, Cisneros-Trujillo S, Mann J, Sublette E. The Role of Cytokines in the Pathophysiology of Suicidal Behavior. Psychoneuroendocrinology. 2016; 63: 296–310. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2015.10.008.
6. Misiak B, Stańczykiewicz B, Kotowicz K,

Rybakowski J, Samochowiec J, Frydecka D. Cytokines and C-reactive protein alterations with respect to cognitive impairment in schizophrenia and bipolar disorder: A systematic review. Schizophr Res. 2018; 192: 16–29. DOI: 10.1016/j.schres.2017.04.015.

7. Himmerich H, Patsalos O, Lichtblau N, Ibrahim M, Dalton B. Cytokine Research in Depression: Principles, Challenges, and Open Questions. Front. Psychiatry. 2019; 10:30. DOI: 10.3389/fpsyt.2019.00030.
8. Ferreira-Gaona MI, Díaz-Reissner CV, Pérez-Bejarano NM, Cueto-González NC, Leggio-González TG, Cardozo-Lovera LB, et al. Nivel de ansiedad de los pacientes antes de ingresar a la consulta odontológica. Rev Cienc Salud. 2018;16(3):463-72. DOI: 10.12804/revistas.urosario.edu.co/revsalud/a.7266.
9. Polacchinia A, Girardib D, Falcob A, Zanottac N, Comarc M, De Carlob N, Tongiorgia E. Distinct CCL2, CCL5, CCL11, CCL27, IL-17, IL-6, BDNF serum profiles correlate to different job-stress outcomes. Neurobiol Stress. 2018; 8: 82–91. DOI: 10.1016/j.ynstr.2018.02.002.
10. Kany S, Vollrath J, Relja B. Cytokines in Inflammatory Disease. Int. J. Mol. Sci. 2019; 20: 6008. DOI:10.3390/ijms20236008
11. Himmerich H, Fischer J, Bauer K, Kirkby K, Sack U, Krügel U. Stress-induced cytokine changes in rats. Eur. Cytokine Netw. 2013; 24: 97-103. DOI: 10.1684/ecn.2013.0338.
12. Rose-John, S. Interleukin-6 Family Cytokines. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2018; 1:10. pii: a028415. DOI: 10.1101/cshperspect.a028415.
13. Pagliarone A, Missima F, Orsatti C, Bachiega T, Sforcin J. Propolis effect on Th1/Th2 cytokines production by acutely stressed mice. J Ethnopharmacol. 2009; 125: 230–233. DOI: 10.1016/j.jep.2009.07.005.
14. Li H, Zhao J, Chen M, Tan Y, Xiaohua Y, Claude Y, Yin D. Toll-like receptor 9 is required for chronic stress-induced immune suppression. Neuroimmunomodulation. 2018; 21: 1–7. DOI: 10.1159/000354610.
15. Aguirre-Siancas, EE. Bases neurocientíficas de la función masticatoria y su efecto sobre el estrés y las funciones cognitivas. Rev. chil. neuro-psiquiat. 2017; 55: 9-17. DOI: 10.4067/S0717-92272017000100002.
16. Teixeira F, Pereira L, Noronha P, Dos Santos M, Gomes W, Ferraz M, Lima R. Masticatory deficiency as a risk factor for cognitive dysfunction. Int J Med Sci. 2014; 10;11(2):209-14. DOI: 10.7150/ijms.6801.
17. Kubo K, Iinuma M, Chen H. Mastication as a Stress-Coping Behavior. BioMed Res Int. 2015; 1-11. DOI: 10.1155/2015/876409.
18. Kubo K. Effects of Active Mastication on Chronic Stress-Induced Bone Loss in Mice. Int J Med Sci. 2015; 12: 952-957. DOI: 10.7150/ijms.13298.
19. Nishigawa K, Suzuki Y, Matsuka Y. Masticatory performance alters stress relief effect of gum chewing. J Prosthodont Res. 2015; 59: 262 – 267. DOI: 10.1016/j.jpor.2015.07.004.
20. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Eight ed. Washington D.C.: National Academy Press; 2011.
21. Lam-Figueroa N, Alzamora-Gonzales L, Colona-Vallejos E, Arone-Farfán R, Ruiz-Ramírez E, Crispín-Huamaní L, Portilla-Flores O, Alarcón-Velásquez L, Aguirre-Siancas E. Influencia del tipo de masticación sobre el estrés crónico en los niveles leucocitarios. Rev. chil. neuro-psiquiat. 2020; 58: 221-229. DOI: 10.4067/S0717-92272020000300221
22. Aguirre Siancas EE. Influence of chewing behaviour on memory and spatial learning in albino BALB/c mice. Neurología. 2017;32(4):236-240. DOI:10.1016/j.nrl.2015.11.008
23. Danneman P, Suckow M. & Brayton C. The laboratory mouse. 2nd Edition. London: CRC Press Inc; 2012.
24. Voorhees JL, Tarr AJ Wohleb ES, Godbout JP, Mo X, Sheridan JF, Eubank TD, Marsh CB. Prolonged restraint stress increases IL-6, reduces IL-10, and causes persistent depressive-like behavior that is reversed by recombinant IL-10. PloS one. 2013; 8(3): e58488. DOI: 10.1371/journal.pone.0058488.
25. Cheng Y, Jope RS, Beurel E. A pre-conditioning stress accelerates increases in mouse plasma inflammatory cytokines induced by stress. BMC neurosci. 2015; 16: 31. DOI:10.1186/s12868-015-0169-z.
26. Rong SUN, Qiong MA, Li DU, Jin-ling CAI,

Xiao-yun YANG, Yan GAO, Yu-fang CUI, Jian-ping MAO. Changes of mouse cytokines and Th1/Th2 balance in acute stress induced by millimeter-wave. Med J Chin PLA. 2013; 38: 859-862. DOI: 10.11855/j.issn.0577-7402.2013.10.017.

27. Yang, P., Gao, Z., Zhang, H., Fang, Z., Wu, C., Xu, H., & Huang, Q. J. Changes in proinflammatory cytokines and white matter in chronically stressed rats. Neuropsychiatric disease and treatment. 2015; 11, 597-607. DOI:10.2147/NDT.S78131.
28. Pertsov SS, Kalinichenko LS, Koplik EV, Alekseeva V, Kirbaeva NV, Sharanova NE. Dynamics of Blood Cytokine Concentrations in Rats with Different Behavioral Characteristics after Acute Stress. Neurosci Behav Physi. 2017; 47: 173. DOI: 10.1007/s11055-016-0382-y.
29. Audet MC, Mangano EN, Anisman H. Behavior and pro-inflammatory cytokine variations among submissive and dominant mice engaged in aggressive encounters: moderation by corticosterone reactivity. Front Behav Neurosci. 2010; 4: 156. DOI:10.3389/fnbeh.2010.00156.
30. Tian R, Hou G, Li D, Yuan TF. A Possible Change Process of Inflammatory Cytokines in the Prolonged Chronic Stress and Its Ultimate Implications for Health. ScientificWorldJournal. 2014; Article ID 780616, 8 pages, 2014. DOI: 10.1155/2014/780616.
31. Wang, S., Wang, C., Yu, Z., Wu, C., Peng, D., Liu, X., Liu, Y., Yang, Y., Guo, P. y Wei, J. Agarwood Essential Oil Ameliorates Restrain Stress-Induced Anxiety and Depression by Inhibiting HPA Axis Hyperactivity. Int J Mol Sci. 2018; 19(11), 3468. DOI: 10.3390/ijms19113468.
32. Assaf A, Reem Al-Abbassi, Maysaa Al-Binni. Academic stress-induced changes in Th1- and Th2-cytokine response. Saudi Pharm J. 2017; 25: 1237-1247. DOI: 10.1016/j.jsps.2017.09.009.

Correspondencia a:
Elías Ernesto Aguirre Siancas
Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
Avenida Grau 755. Lima, Perú.
Correo electrónico: eaguirres@unmsm.edu.pe