

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS.
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR.**



**EFFECTOS DE LA EXPOSICIÓN PRENATAL A ESTRÉS
POR FRÍO SOBRE EL OVARIO Y LA ACTIVIDAD
NERVIOSA A NIVEL CENTRAL Y PERIFÉRICO EN
RATAS ADULTAS.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE
BIOQUÍMICO**

CLAUDIO ENRIQUE ARAYA QUIJADA

**PROFESOR PATROCINANTE Y DIRECTOR DE MEMORIA:
DR. HERNÁN LARA PEÑALOZA**

**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacéuticas. Universidad de Chile.**

**Santiago de Chile
2008**

Esta memoria de título ha sido financiada por el proyecto Fondecyt 1050765.

Fue realizada bajo el patrocinio y dirección del Dr. Hernán Lara Peñaloza, en el Laboratorio de Neurobioquímica del Departamento Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y farmacéuticas de la Universidad de Chile.

AGRADECIMIENTOS

· A mi madre y hermano por sus consejos, comprensión y permanente apoyo en toda mi vida.

· A mis amigos de la comunidad CENLIMI, por ofrecerme en todo momento un descanso en este turbulento mundo lleno de intereses propios.

· Al Dr. Hernán Lara, que más que un académico lo considero una persona, lo que hace que trascienda a toda institución.

· A mis compañeros del Laboratorio de Neurobioquímica por mostrarme el aspecto más amistoso de la Universidad, refiriéndome a Eric, Gonzalo, Sergio, Ariel, no olvidándome de Mauricio, Ramón, Pablo y Nicolás, ni queriendo omitir a Monika, Alfonso y Leticia que por sus sencillas actitudes me hicieron olvidar sus grados académicos.

· A Naria, Claudia, María José y Lorena, por su ayuda prestada en las determinaciones.

ÍNDICE GENERAL

	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL -----	I
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS -----	II
LISTA DE ABREVIACIONES -----	IV
RESUMEN -----	VI
SUMMARY -----	VIII
INTRODUCCIÓN -----	1
HIPÓTESIS -----	4
OBJETIVOS GENERAL -----	4
OBJETIVOS ESPECÍFICO -----	4
MATERIALES Y MÉTODOS -----	4
RESULTADOS -----	9
DISCUSIÓN -----	32
CONCLUSIONES -----	38
REFERENCIAS -----	40
ANEXOS -----	43

ÍNDICE FIGURAS Y TABLAS

	PÁGINA
Figura 1: Efecto del estrés prenatal sobre el número total de neonatos -----	10
Figura 2: Efecto del estrés prenatal sobre el número total de neonatos machos -----	11
Figura 3: Efecto del estrés prenatal sobre el número total de neonatos hembras -----	11
Figura 4: Curva de crecimiento de ratas Sprawe-Dawley hembras -----	12
Figura 5: Contenido hipotalámico de neurotransmisores y metabolitos en estro -----	14
Figura 6: Contenido hipotalámico de neurotransmisores y metabolitos en diestro -----	14
Figura 7: Actividad monoaminérgica de hipotálamo en periodo estro -----	15
Figura 8: Actividad monoaminérgica de hipotálamo en periodo diestro -----	15
Figura 9: Contenido de catecolaminas en glándula adrenal de ratas -----	16
Figura 10: Contenido de noradrenalina en ganglio celiaco -----	17
Figura 11: Curva de apertura vaginal -----	18
Figura 12: Efecto del estrés prenatal sobre el ciclo estral de las ratas -----	19
Figura 13: Contenido de noradrenalina en ovario de rata -----	20
Figura 14: Secreción espontánea de progesterona en ovario de rata -----	21
Figura 15: Secreción espontánea de androstenediona en ovario de rata -----	22
Figura 16: Secreción espontánea de estradiol en ovario de rata -----	23
Figura 17: Función lútea del ovario en la secreción espontánea de esteroides -----	24
Figura 18: Número total de folículos en la sección mayor del ovario -----	26
Figura 19: Número de folículos sanos en la sección mayor del ovario -----	27

Figura 20: Número de folículos atrésicos en la sección mayor del ovario -----	27
Figura 21: Número de folículos preantrales en la sección mayor del ovario -----	28
Figura 22: Porcentaje de distribución de folículos antrales sanos por tamaño en sección mayor del ovario -----	28
Figura 23: Porcentaje de distribución de folículos antrales atrésicos por tamaño en la sección mayor del ovario -----	29
Figura 24: Número de folículos antrales sanos por tamaño en la sección mayor del ovario -----	30
Figura 25: Número de folículos antrales atrésicos por tamaño en la sección mayor del ovario -----	30
Figura 26: Número total de cuerpos lúteos en la sección mayor del ovario -----	31
Tabla 1: Cantidad de neonatos al tercer día de vida, por camadas y en porcentajes -----	9

ABREVIACIONES

SOP:	Síndrome de ovario poliquístico
SNA:	Sistema nervioso autónomo
NPV:	Núcleo paraventricular
NDM:	Núcleo dorso medial
HHA:	Hipotálamo-hipófisis-adrenal
TRH:	Hormona liberadora de tirotrópina
NGF:	Factor de crecimiento nervioso
p75 NTR:	Receptor de baja afinidad para NGF
NA:	Noradrenalina
CAs:	Catecolaminas
TH:	Tirosina hidroxilasa
LH:	Hormona luteinizante
FSH:	Hormona folículo estimulante
E1-21:	Entre día 1 y 21 de gestación se aplicó estrés a ratas madres preñadas
HVM:	Núcleo Hipotálamo Ventromedial
PCA:	Ácido perclórico
HPLC:	Cromatografía líquida de alta resolución
BSA:	Albúmina de suero de bovino
DPBS:	Buffer difosfato salino
EIA:	Enzyme immunoassay
P₄:	Progesterona
Δ₄:	Androstenediona

E₂:	Estradiol
5-HT:	Serotonina
DA:	Dopamina
5-HIAA:	Ácido 5-hidroxiindol acético
DOPAC:	3,4-dihidroxi-fenil-acético

RESUMEN

El estrés reconocido como un desequilibrio provocado por un estímulo, tiene múltiples efectos sobre los organismos vivos y además en órganos específicos. Nuestro laboratorio ha encontrado que el estrés por frío activa la inervación simpática que llega al ovario, junto con producir cambios importantes en el desarrollo folicular y la función reproductiva. Sumado a esto, se conoce que la descendencia es sensible a varios estímulos estresantes que son experimentados por la madre; así en esta Memoria, probamos el efecto del estrés frío aplicado a la rata madre durante la preñez sobre las ratas hijas de la descendencia. Usamos un procedimiento previamente descrito de estrés frío crónico (3h/día a 4°C) aplicado a ratas Sprague-Dawley durante los 21 días de preñez (E1-21). Después del procedimiento de estrés, las crías fueron estudiadas durante el desarrollo (número y sexo de crías sobrevivientes), durante la pubertad (edad de la apertura vaginal) y cuando ratas adultas, su actividad cíclica estral, la actividad secretora de esteroides ováricos, el desarrollo folicular y la concentración de neurotransmisores. En paralelo, el contenido hipotalámico de monoaminas (dopamina y serotonina) y sus respectivos metabolitos fueron determinados. Las ratas adultas fueron eutanasiadas durante etapas estro y diestro para estudiar la respuesta antes y después de la ovulación.

El estrés aplicado en la madre provocó un incremento en el número de nacimientos de machos comparado al de las hembras, el peso corporal de las ratas hijas hembras, la apertura vaginal y la actividad cíclica estral no fue afectada. Cuando las ratas adultas, los hipotálamos mostraron una disminución en la actividad serotoninérgica y dopaminérgica en etapa estro. El contenido de noradrenalina (NA) en el ganglio celiaco (donde se proyectan las neuronas noradrenérgicas al origen del ovario) respondió con un descenso de NA en ratas eutanasiadas en estro y una tendencia a incrementarse cuando las ratas fueron sacrificadas en diestro. Las catecolaminas adrenales decrecieron en ambas etapas del periodo estral en el grupo estresado. En el ovario, analizamos la relación entre el contenido de catecolaminas (NA) y la secreción espontánea de esteroides. Durante estro encontramos una directa correlación entre un descenso del contenido de NA y la reducida secreción de androstenediona (Δ_4) y de estradiol (E_2). Encontramos una incrementada función luteal del ovario, situación que fue verificada por un alto número de cuerpos lúteos. En conclusión el estrés por frío, como un ejemplo de estrés físico, durante la gestación, produjo importantes

cambios a nivel hipotalámico, de la actividad nerviosa periférica y en el eje adrenal, lo cual se traduce en cambios permanentes en la función ovárica del animal durante su vida adulta.

SUMMARY

Stress as a disequilibrium provoked by a stimulus has multiples effects on living organisms and specific organs. Our laboratory has found that cold stress activates the sympathetic innervation reaching the ovary and produced important changes in the ovarian follicular development and reproductive function. In addition, it is known that offspring are sensitive to various stressful stimuli being experienced by the mother, thus in this Memory we wanted to test the effect produced on the offspring when adult mothers were under cold stress during pregnancy. We used a previously described chronic cold stress procedure (3h/day at 4°C) applied to Sprague-Dawley rats during the whole 21 days of pregnancy (E1-21). After the stress procedure, pups were studied during development (number and sex of pups surviving), during puberty (age of vaginal opening) and when adults, their estrous cycling activity, ovarian steroid secretory activity, follicular development and concentration of neurotransmitter. In parallel, the hypothalamic content of monoamines (dopamine and serotonin) and its metabolites were determined. The adult rats were euthanized during diestrus and estrus to study the response before and after ovulation.

After stress there was an increased number of male pups compared to females, the body weight of female offspring, vaginal opening and estrous cycling activity were not affected. In the adult rat hypothalamus the turnover of serotonin and dopamine decreased in estrus. Noradrenaline (NA) content at coeliac ganglion (where noradrenergic neurons projecting to the ovary originates), the E1-21 group respond with a decrease in NA in rats euthanized in estrus and a tendency to increase when rats were sacrificed in diestrus. The adrenal catecholamines decreased in both stages of estrous cycles in the groups stressed. In the ovary we analyze the relationship between catecholamines (NA) content and the spontaneous secretion of steroids. During estrus we found a direct correlation between a decreased content of NA and reduced secretion of androstenedione ($\Delta 4$) and estradiol (E2) secretion in the group E1-21. We also found an enhanced luteal function of the ovary, situation that was verified by an increased number of corpus luteum.

In conclusion, cold stress, as an example of physical stress, during gestation, may produce major changes in hypothalamic level, in the activity of peripheral nerves and in the adrenal axis, which result in permanent changes in ovarian function of the animal during its adult life.

INTRODUCCIÓN

El ovario ejerce dos funciones principales como son el desarrollo del gameto femenino (gametogénesis) y la producción de hormonas, tanto esteroidales como peptídicas, las cuales actúan sobre el mismo órgano u otros, tal como útero, vagina, glándula mamaria y otras estructuras (Ojeda *et al.*, 2000).

Existen bastantes evidencias que apoyan la hipótesis que la actividad ovárica está controlada por mecanismos neuronales de origen cerebral que son complementarios a la regulación clásica hormonal. Kawakami (Kawakami *et al.*, 1981) fue el primero en presentar evidencias sobre la existencia de una vía de control neuronal desde el hipotálamo al ovario, lo que permitió posteriores estudios neuroquímicos sobre la relación funcional entre el sistema nervioso autónomo (SNA) y ovario, tanto en la función ovárica normal (Lara *et al.*, 2002), como en condiciones patológicas, por ejemplo durante el síndrome de ovario poliquístico (SOP) (Barria *et al.*, 1993). Los estudios de Gerandai (Gerandai *et al.*, 1998) confirmaron lo anterior y permitieron definir al núcleo paraventricular (NPV) del hipotálamo como la región del cerebro desde donde se proyectan las neuronas, ya sea directa o indirectamente a través del núcleo dorso medial (NDM), hacia las neuronas preganglionares simpáticas a nivel del ganglio celiaco, cuyas fibras postganglionares inervan directamente al ovario (Gerandai *et al.*, 1998).

Una forma de inducir la activación simpática es por medio del estrés, procedimiento que asemeja de manera más fisiológica lo que podría ocurrir en humanos. La elección del tipo y duración del estrés para lograr la activación nerviosa, es de gran importancia considerando que se ha demostrado que las ratas sometidas a diferentes tipos de estrés tienen una respuesta neuroquímica heterogénea, lo que indica que no todos los mecanismos para producir estrés activarían las mismas rutas neuroendocrinas (Pacak *et al.*, 1998).

En la literatura está descrito que frente a cualquier estrés, ya sea físico como el dolor, frío, calor; ó psicológico como la inmovilización, el organismo activa el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y/o el sistema simpatoadrenal (Kvetnanský *et al.*, 1995), esquematizado con una primera neurona colinérgica y una segunda noradrenérgica. Sin embargo, dependiendo del tipo y duración del estrés es la magnitud con que ocurren estas respuestas.

El conjunto de esta información, ha abierto nuevas expectativas de estudio para relacionar respuestas nerviosas centrales con los cambios producidos en el ovario en situaciones normales y bajo la condición de estrés. Siguiendo esta línea se encontró que la hormona liberadora de tiotropina (TRH), hormona secretada durante el estrés de frío, es capaz de activar la vía nerviosa autonómica del sistema simpático que conecta el cerebro con el ovario (Luza *et al.*, 2003). Por otro lado, la activación de los nervios simpáticos ováricos es dirigida por un incremento de la expresión intraovárica de los genes codificadores del factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor neurotrófico responsable de crecimiento y sobrevivencia de neuronas simpáticas, y su receptor de baja afinidad, p75 NTR.

Existen muchas evidencias que involucran a los glucocorticoides liberados por estrés como agentes que restringen la respuesta nerviosa simpática (Kvetnanský *et al.*, 1995 y Kvetnanský *et al.*, 1993). La adrenalectomía induce un aumento *per se* en la liberación de noradrenalina (NA) ovárica (Gálvez *et al.*, 1999). Por otra parte el tratamiento con corticoides revierte el aumento en la síntesis, recambio, liberación, recaptación y metabolismo de las catecolaminas (CAs) inducido por la adrenalectomía (Gálvez *et al.*, 1999).

En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio, en el cual se utilizó un estrés crónico intermitente combinado de inmovilización y frío se provocó la activación de los nervios simpáticos ováricos y la aparición de estructuras prequísticas en el ovario (Paredes *et al.*, 1998). Sin embargo, el estrés por inmovilización es un potente activador del eje HHA y por ende de la secreción de corticosterona (Pacak *et al.*, 1998).

Así, con el fin de no restringir la respuesta simpato neuronal, la cual se sabe que es bloqueada por la corticosterona (principal glucocorticoide en las ratas), decidimos que el estrés por frío sería un buen activador de la respuesta simpática, ya que datos publicados demuestran que el estrés crónico intermitente por frío no activa el eje HHA, pero si activa un aumento en la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH) en la glándula adrenal (Bhatnagar *et al.*, 1995). Esta enzima, marcapaso en la síntesis de NA, es regulada principalmente por la vía nerviosa (Mueller *et al.*, 1969). De esta forma, con el estrés por frío se pretende activar el sistema nervioso simpático ovárico, en ausencia de agentes que limiten esta activación.

Por otro lado, Guo (Guo *et al.*, 1993) evaluó el efecto de exponer ratas preñadas a un estrés combinado de nado en agua fría en diferentes periodos de la gestación, encontrando dos hitos importantes: que la tasa de mortalidad fue mayor en el grupo donde se aplicó estrés en la primera mitad de dicho periodo y apareció un número significativo de neonatos con retardo en el crecimiento. Guo (Guo *et al.*, 1993) concluyó que el estrés administrado en la primera mitad de preñez provocó efectos postnatales dañinos que fueron probablemente incrementados por la interrupción del suministro de estrés en la segunda mitad de la gestación (Guo *et al.*, 1993).

El antecedente de Guo nos aproxima a considerar los estudios epidemiológicos de Barker (Barker *et al.*, 1998) y el concepto de programación fetal. Éste considera que las condiciones que prevalecen en el útero durante el desarrollo prenatal, juegan un importante rol para la vida adulta, por ejemplo, mostró que la probabilidad de que un individuo muera por alguna enfermedad cardíaca es incrementada en un 50 % en hombres cuyo peso al nacer fue menor de 2,5 Kg. comparado con hombres cuyo peso al nacer fue de 4,3 Kg., así usó el peso al nacer como un marcador de nutrición fetal, y lo relacionó a enfermedades cardíacas en la etapa adulta. También indicó que la fisiología del aparato reproductor femenino es afectado en útero, por ejemplo, citó el hecho que la edad de menarquia, se adelanta en jóvenes con bajo peso al nacer, el que es recuperado a los 7 años de edad, opuestamente a las que tuvieron más peso al nacer y a los 7 años de edad eran delgadas, su menarquia se retardó. Sugirió que la menarquia está programada en útero y asociada, estrechamente, al crecimiento fetal y postuló que ésta obedece a la programación del patrón de liberación de gonadotrofinas, donde la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) es iniciada en útero, continua a través de la infancia y cesa hasta reanudarse en la pubertad (Barker *et al.*, 1998).

De este modo, con los antecedentes que: a.- el estrés de frío afecta la inervación simpática que llega al ovario, b.- al aplicar estímulos estresantes a ratas preñadas se afecta la descendencia, y c.- estudios epidemiológicos muestran que las condiciones que prevalecen en el útero durante el desarrollo prenatal juegan un importante rol para la vida adulta, proponemos lo siguiente:

Hipótesis: El estrés crónico por frío provoca cambios en la gestación de ratas hembras preñadas, lo que afecta en forma permanente la actividad nerviosa simpática del ovario y la función reproductiva de las hembras de la descendencia.

Objetivo general:

Evaluar los cambios en ratas hembras adultas que ocurren en el ovario y en la regulación nerviosa a nivel central y periférico, al ser sometidas a estrés por frío crónico intermitente durante el desarrollo prenatal.

Objetivos específicos:

- 1.- Determinar si el estrés prenatal afecta el desarrollo postnatal de las crías.
- 2.- Analizar si el periodo de estrés prenatal aplicado afecta al control nervioso ovárico de las crías en la etapa adulta.
- 3.- Evaluar cambios neuroendocrinos y morfológicos en los ovarios de ratas adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales. Se usaron ratas hembras vírgenes Sprague-Dawley con un peso entre 250 y 300 grs., las condiciones de temperatura y luz-oscuridad fueron constantes, 20 °C y 12 horas de luz y oscuridad respectivamente, el alimento y agua a libre disposición.

Las ratas en proestro se colocaron en la misma jaula con un macho desde el medio día hasta la mañana del día siguiente, cuando se realizó un frotis vaginal para evidenciar la presencia de espermatozoides. La mañana de detección de espermatozoides se consideró como día cero de gestación.

Ratas preñadas fueron divididas en dos grupos: (1) grupo control: mantenidas a temperatura ambiental durante todo el periodo de la gestación y (2) grupo E1-21: entre día 1 y 21 de gestación se aplicó estrés.

El estrés aplicado fue exponer ratas por tres horas diarias a 4 °C en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, en el periodo de tiempo antes definido, de acuerdo al grupo a estudiar.

El día de parición de neonatos se consideró como cero y pasado 24 horas, la descendencia cumplió un día de vida. Al tercer día se controló la proporción de hembras/machos para

aproximarla a 2/1. Las crías se mantuvieron junto a la madre hasta el destete, día 21, posteriormente permanecieron las hembras en jaulas a temperatura ambiente. Se controló la apertura vaginal como índice de inicio de la pubertad, y posteriormente la ciclicidad estral por frotis vaginal. Cumplido el día 60 de vida, fueron eutanasiadas e inmediatamente se procedió a extraer ovarios, médula adrenal, ganglio celiaco y el núcleo hipotálamo ventromedial (HVM), los cuales fueron mantenidos a -50 °C hasta el posterior y respectivo procesamiento.

Todos los procedimientos experimentales en animales fueron aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Contenido de catecolaminas e indolaminas en hipotálamo. El HVM se pesó, posteriormente homogeneizó en frío con 400 µL de PCA 0,2 N en un homogenizador vidrio-vidrio y centrifugó a 13.000 rpm a 4 °C por 15 minutos y se filtró el sobrenadante mediante filtro de 0,22 µm (MILLIPORE®) y posterior determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a detección electroquímica (Chi *et al.*, 1999).

Contenido de noradrenalina en ganglio celiaco. El ganglio celiaco fue homogenizado en 1 mL de PCA 0,2 N en un homogenizador vidrio-vidrio y centrifugado a 12000 rpm por 15 minutos a 4 °C, el sobrenadante se almacenó a -50 °C hasta la posterior determinación mediante HPLC acoplado a detección electroquímica. Previo a la medición se efectuó un procedimiento de filtración mediante filtro de 0,22 µm (MILLIPORE®)

Contenido de catecolaminas en glándula adrenal. La glándula se pesó y homogeneizó en 0,5 mL de ácido perclórico 0,05 N con un homogenizador vidrio-vidrio, se agregó 0,5 mL de H₂O, se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos para finalmente determinar las catecolaminas mediante el método de von Euler y Hamberg (von Euler y Hamberg, 1949), basado en la oxidación de adrenalina y noradrenalina a adrenocromo y noradrenocromo en donde presentan una absorción a 540 nm. Las catecolaminas presentes en el sobrenadante (200 µL) se oxidan en presencia de I₂/I⁻, finalmente se leyó la absorbancia a 540 nm.

Determinación de proteínas en glándula adrenal. Se procedió según el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1991), utilizando albúmina de suero de bovino (BSA) como estándar; se tomaron alícuotas de 50 μ L en 4 mL de NaOH 1 N.

Contenido de noradrenalina en ovario. Medio ovario previamente almacenado a -50 °C se pesó y homogeneizó con 10 veces su volumen de DPBS (KCl 2,68 mM, NaCl 136,89 mM, KH_2PO_4 1,47 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM, $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 0,9 mM y MgCl_2 0,49 mM) con un homogeneizador vidrio-vidrio, luego se tomó 100 μ L de homogeneizado y agregó 20 μ L de PCA 1,2 N para centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos, finalmente se completó un volumen de 205 μ L con PCA 0.2 N y filtró el sobrenadante mediante filtro de 0,22 μ m (MILLIPORE[®]) y posterior determinación mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) acoplado a detección electroquímica.

Secreción de esteroides *in vitro*. Se realizó el mismo procedimiento descrito previamente (Paredes, 1993), utilizando ovarios izquierdos de ratas recién eutanasiadas. El ovario se preincubó en 2 mL de solución Krebs bicarbonato-albúmina pH 7.4 (NaCl 118,6 mM, KCl 4,7 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, MgSO_4 1,2 mM, NaHCO_3 25 mM, CaCl_2 2,5 mM, glucosa 25 mM, ácido ascórbico 0,6 mM, EDTA 0,15 mM y albúmina 0,1 g/L), posteriormente se incubó durante 3 horas con solución Krebs bicarbonato-albúmina pH 7,4. Al término del procedimiento se separó el medio de incubación para ser usado en la determinación de esteroides y se guardó a -50 °C hasta efectuar las respectivas mediciones.

Determinación de esteroides. La cantidad de progesterona, androstenediona y estradiol en sobrenadante, obtenido de la incubación de ovarios, se determinó mediante EIA (enzyme immunoassay) para progesterona (P_4), androstenediona (Δ_4) y estradiol (E_2) (Alpco Diagnostic ELISA kits, American Lab Products Co., Windham, NH), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los respectivos valores de sensibilidad, en unidades de concentración, y precisión intra e interensayo, recomendado por el fabricante, son expresados por el coeficiente de variación.

Progesterona: Sensibilidad de 0,1 ng/ml.; precisión intra-ensayo 10,6% - 10,2% e interensayo 12,6% - 10,6% para diferentes puntos de la curva estándar.

Androstenediona: Sensibilidad de 0,05 ng/ml.; precisión intraensayo 6,7%, 6,1% y 4,9% e interensayo 14,6%, 12,7% y 11,5% para diferentes puntos de la curva estándar.

Estradiol: Sensibilidad de 10 ng/ml.; precisión intra-ensayo 9,3%, 9,1% y 4,6% e interensayo 10,1%, 9,8% y 6,2% para diferentes puntos de la curva estándar.

Estudio histológico del ovario. Inmediatamente luego de eutanasiar ratas, en el respectivo ciclo estral, los ovarios derechos se fijaron con solución fijadora Dubos Q Brazil, se incluyeron en parafina, se cortaron a 8 μ m y se tiñeron con hematoxilina-eosina, este tratamiento se realizó en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

El estudio morfológico consistió en contar y medir folículos, de acuerdo a la descripción efectuada por Lara (Lara *et al.*, 2000), además de información adicional (Gougeon, 2004 y Dorfman, 2001), que ha sido utilizada en nuestro laboratorio. Esta clasificación está basada en la presencia, características y disposición de las células teca y granulosa, así folículos preantrales fueron definidos como folículos sin cavidad y con una, dos o más capas de células de granulosa. Dentro de este grupo están los folículos primordiales (el ovocito está rodeado por células de granulosa aplanadas), primarios (ovocito rodeado por una capa simple de células de granulosa cuboidal) y secundarios (folículos con dos o más capas completas de células de granulosa rodeando el ovocito, además de presentar células de teca en su cara externa) , y folículos antrales (los que presentan una cavidad antral); también consideramos los cuerpos lúteos (estructuras formadas de los folículos que han ovulado, donde células de la teca y granulosa aumentaron de tamaño por hipertrofia celular y se evidencia vascularización) (Gougeon, 2004). Otras estructuras encontradas son los folículos atrésicos, los cuales son folículos con más de 5% células con núcleo picnótico en la sección mayor, mostrando estrangulamiento de ovocitos y ocasionalmente vesículas germinales rotas; también se incluyó en este grupo folículos que mostraban deformaciones o les faltaba el ovocito. El método que se utilizó para realizar este estudio fue escoger un portaobjeto, aproximadamente del centro de la serie y de éste, seleccionar una sección del ovario que fue objeto del análisis. En el corte en cuestión se hizo un seguimiento de los folículos ahí presentes, tanto hacia arriba o hacia debajo de éste hasta definir el del tipo de folículos que existió en el corte seleccionado.

Análisis estadístico. Todos los resultados se expresan como el promedio \pm error estándar medio de un mínimo de tres muestras provenientes de tres animales diferentes. Para analizar la heterogeneidad de los grupos experimentales se usó el análisis de varianza ANOVA de una cola seguido del test de comparación múltiple Newman-Keuls, para comparar dos datos utilizamos test de Student`s de una cola.

RESULTADOS

Número total de neonatos por camada y separados por sexo.

La tabla número 1 muestra el número de neonatos por camadas y en porcentajes, separados por sexo al tercer día de vida. El grupo control nos indica que en tres de las cuatro camadas más del 60% correspondió a hembras. Al observar el grupo estresado durante todo el periodo de la gestación, notamos que de las cinco camadas, cuatro presentaron porcentajes entre 54 y 86% y una quinta con 50% de machos, de este modo visualizando las camadas individualmente, notamos que efectivamente el grupo control fue más proclive al nacimiento de hembras, contra el resultado inverso en el grupo estresado durante la gestación, donde la tendencia se inclina al nacimiento de machos.

Tabla 1: Efectos del estrés por frío en la madre sobre el número y sexo de las camadas, expresado en cantidad y en porcentajes.

Control					
	Total	Machos	Hembras	Machos (%)	Hembras (%)
Rata 2	5	2	3	40	60
Rata 3	6	2	4	33,33	66,67
Rata 6	12	6	6	50	50
Rata 10	12	4	8	33,33	66,67
PROMEDIO	8,75	3,5	5,25	39,17	60,84
DESVEST.	3,77	1,91	2,22	7,88	7,88
ERROR	1,89	0,96	1,11	3,94	3,94

E1-21					
	Total	Machos	Hembras	Machos (%)	Hembras (%)
Rata 1	8	5	3	62,5	37,5
Rata 5	13	7	6	53,85	46,15
Rata 7	15	10	5	66,67	33,33
Rata 9	7	6	1	85,71	14,29
Rata 11	18	9	9	50	50
PROMEDIO	12,2	7,4	4,8	63,75	36,25
DESVEST.	4,66	2,07	3,03	13,96	13,96
ERROR	2,08	0,93	1,36	6,24	6,24

Número promedio de neonatos.

Los gráficos mostrados a continuación, nos indican el número promedio total de neonatos, ya sea el conjunto de machos y hembras (figura 1), número de machos (figura 2) y de hembras (figura 3). En la figura 1 notamos claramente, una tendencia al aumento del número promedio de neonatos cuando las ratas madres fueron expuestas al estrés por frío. Esta tendencia se debió al incremento en el número de neonatos machos. Al observar la cantidad promedio de hembras no se observan cambios producto del estrés aplicado a la rata madre.

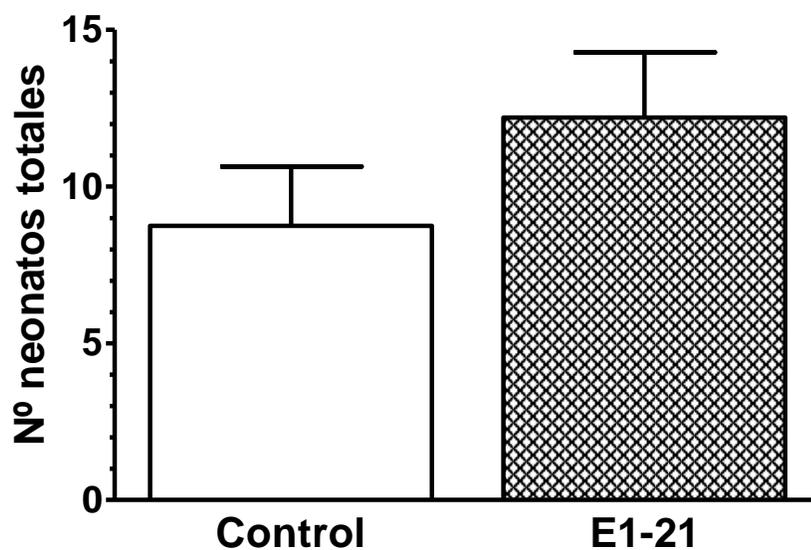


Figura 1: Efecto del estrés prenatal sobre el número total de neonatos. Las observaciones corresponden al promedio \pm error estándar medio. Grupo Control (n = 37) y E1-21 (n = 52).

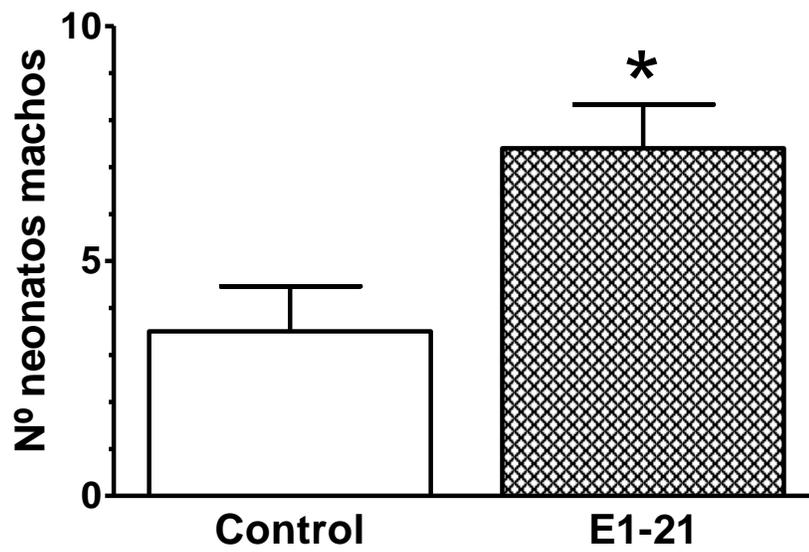


Figura 2: Efecto del estrés prenatal sobre el número total de neonatos machos. Observaciones corresponden a promedio \pm error estándar medio. Grupo Control (n = 16) y E1-21 (n = 29). * $p < 0,05$ E1-21 vs. Control.

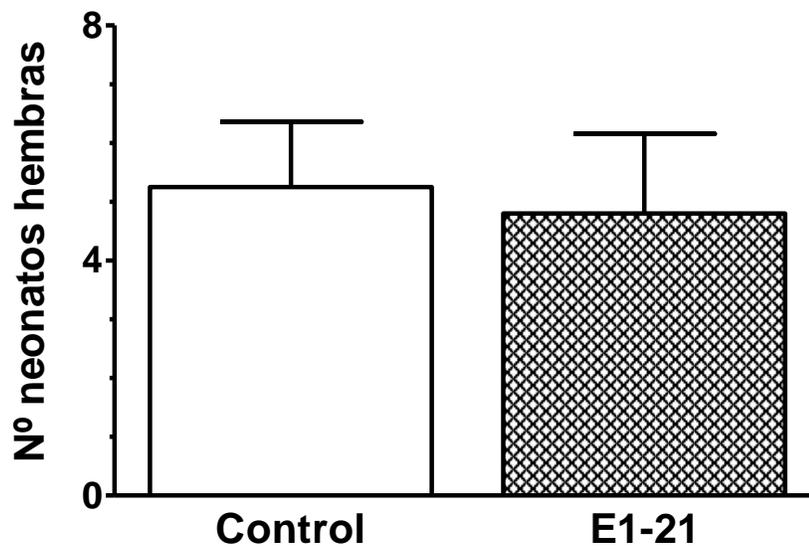


Figura 3: Efecto del estrés prenatal sobre el número total de neonatos hembras. Observaciones corresponden a promedio \pm error estándar medio. Grupo Control (n = 21) y E1-21 (n = 23).

Curva de crecimiento de descendencia hembras expuestas a estrés prenatal.

El análisis de la curva de crecimiento nos proporciona la información de que el estrés aplicado a la madre, durante todo el periodo de la gestación, no afectó la ganancia de peso de las ratas hembras hijas desde los primeros días de vida hasta el necesario proceso de la eutanasia.

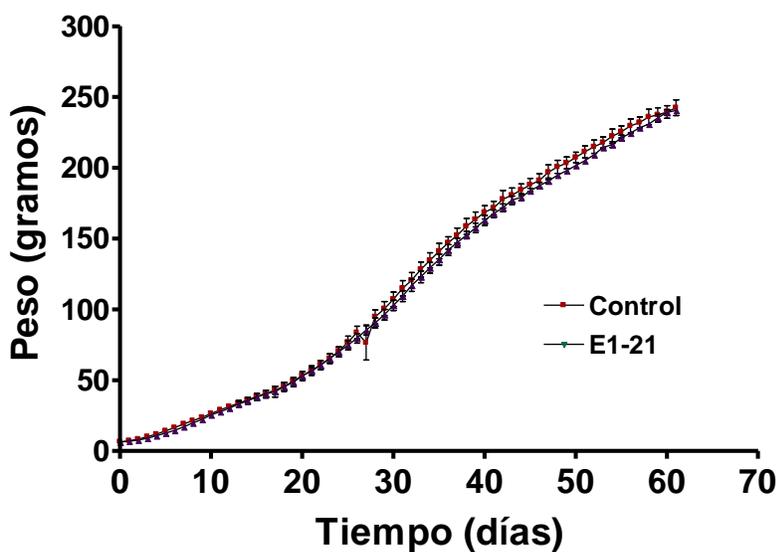


Figura 4: Efecto del estrés frío sobre el crecimiento de ratas Sprawe-Dawley hembras. Cada grupo corresponde al promedio de 4 camadas \pm error estándar medio por grupo.

Contenido de catecolaminas e indolaminas en hipotálamo ventromedial (HVM).

La observación del contenido promedio de neurotransmisores hipotalámicos en ratas sacrificadas en etapa estro (figura 5), nos mostró que éste tendió a incrementarse, aunque la cantidad de sus respectivos metabolitos no fue modificada; en cambio los hipotálamos de las ratas sacrificadas en la etapa diestro (figura 6), presentaron una gran variación, producto de que las monoaminas tendieron a disminuir, resultando significativo el descenso de dopamina (DA). La observación del metabolito de serotonina (5-HT) resultó inesperado, debido a que el ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) tendió a incrementarse a pesar que su precursor 5-HT tendió a disminuir; en contraste, el metabolito de dopamina 3,4-dihidroxi-fenil-acético (DOPAC) siguió la misma tendencia de su precursor DA, ya que ambos disminuyeron.

Actividad monoaminérgica en hipotálamo ventromedial (HVM).

El cálculo de la razón metabolito de neurotransmisor vs. neurotransmisor nos permitió conocer la actividad monoaminérgica en el hipotálamo ventromedial, encontrando que en ratas eutanasiadas en el periodo estro se evidenció un descenso tanto de la actividad serotoninérgica como de la actividad dopaminérgica (figura 7); en cambio, en hipotálamos obtenidos de ratas eutanasiadas en periodo diestro observamos que la actividad dopaminérgica está incrementada (figura 8).

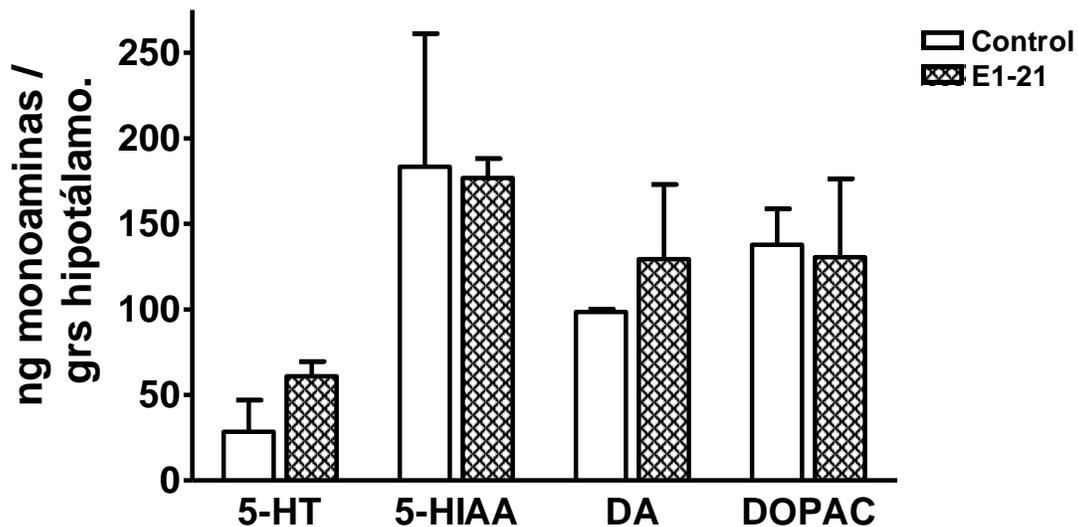


Figura 5: Efecto de estrés prenatal sobre el contenido hipotalámico de neurotransmisores serotonina (5-HT) y dopamina (DA) y metabolitos ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) y 3,4-dihidroxi-fenil-acético (DOPAC), respectivamente, en los hipotálamos de las ratas sacrificadas en la etapa estro de la rata. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 muestras por grupo.

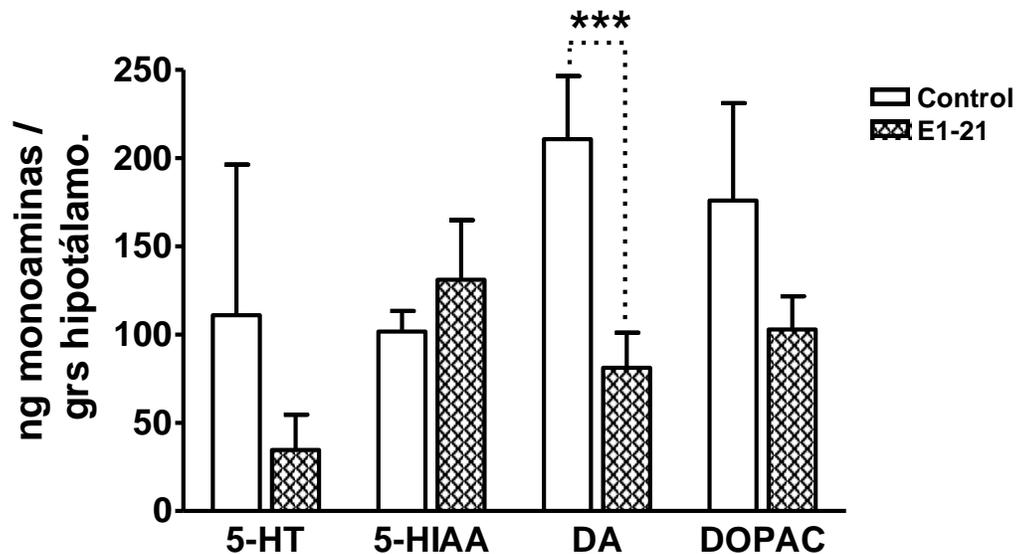


Figura 6: Efecto de estrés prenatal sobre el contenido hipotalámico de neurotransmisores serotonina (5-HT) y dopamina (DA) y metabolitos ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) y 3,4-dihidroxi-fenil-acético (DOPAC), respectivamente, en los hipotálamos de las ratas sacrificadas en la etapa diestro de la rata. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 muestras por grupo. *** $p < 0,001$ E1-21 vs. Control.

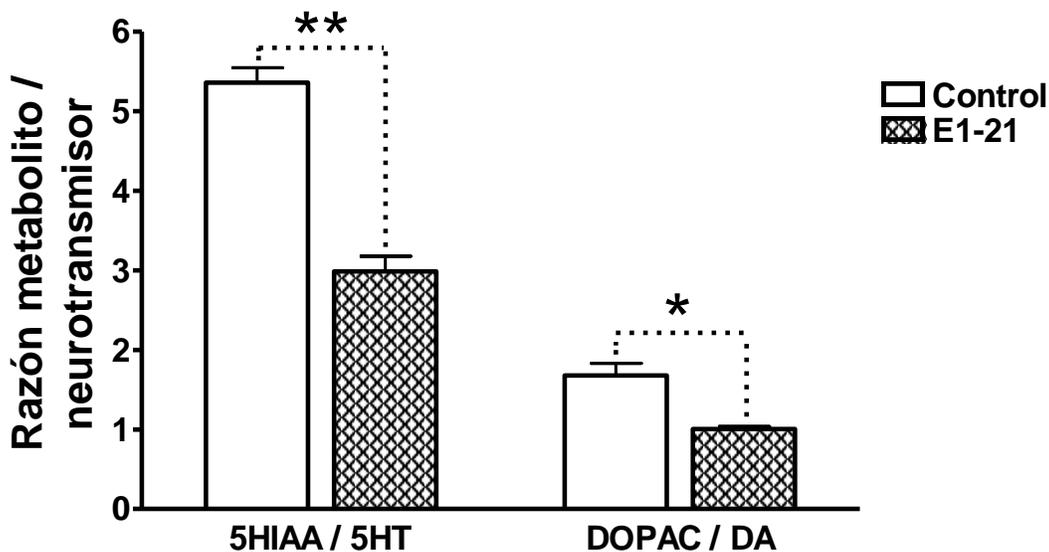


Figura 7: Efecto de estrés prenatal sobre la actividad monoaminérgica de hipotálamo en ratas sacrificadas en periodo estro. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 2 muestras por grupo. ** $p < 0,005$ E1-21 vs. Control y * $p < 0,01$ E1-21 vs. Control.

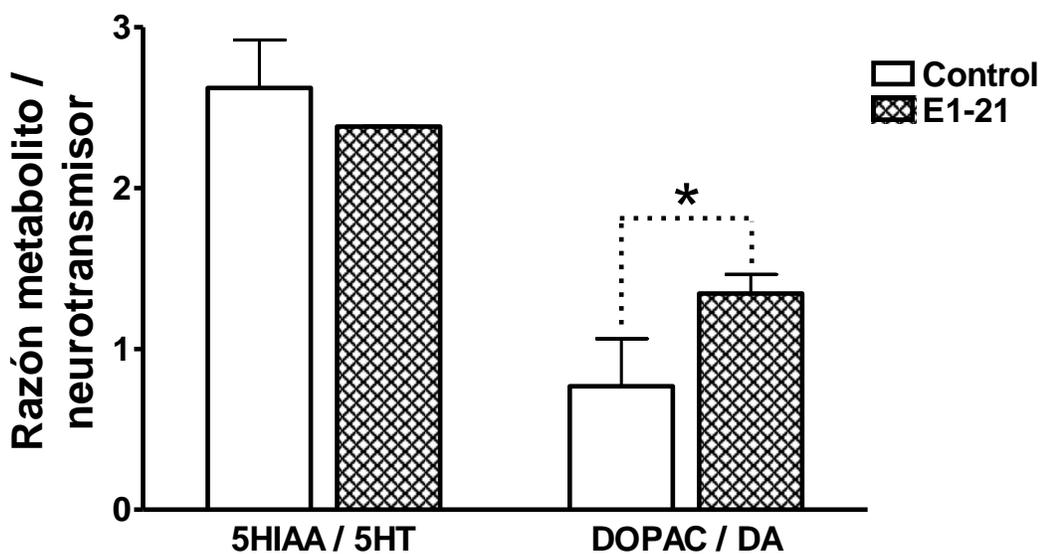


Figura 8: efecto de estrés prenatal sobre la actividad monoaminérgica de hipotálamo en ratas sacrificadas en periodo diestro. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 2 muestras por grupo. * $p < 0,01$ E1-21 vs. Control.

Catecolaminas adrenales.

La determinación del contenido de catecolaminas en la glándula adrenal, mostró una clara disminución del grupo cuya madre fue estresada por frío, esta disminución resultó independiente del periodo estral analizado.

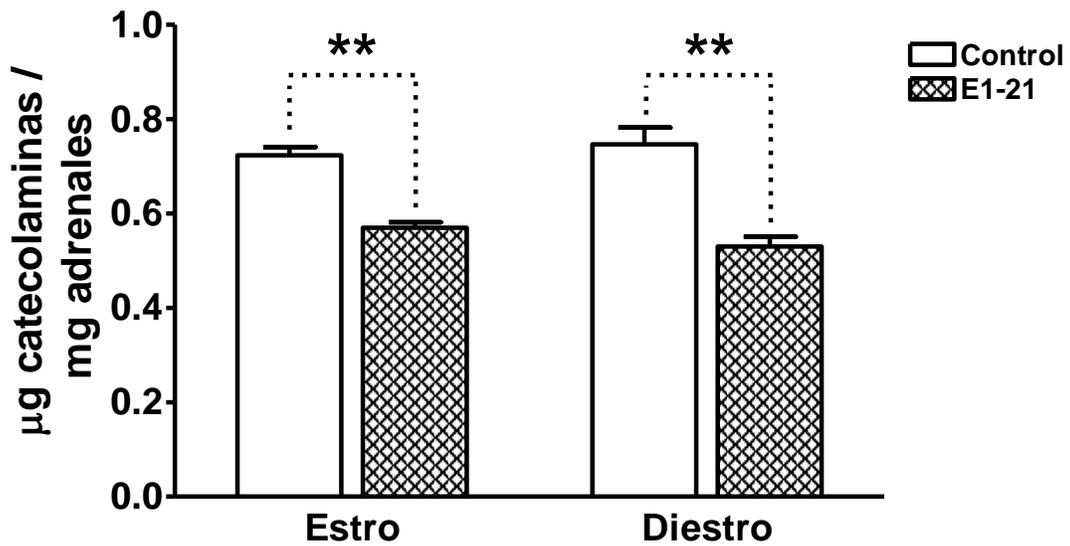


Figura 9: Efecto de estrés prenatal sobre contenido de catecolaminas en glándula adrenal de ratas. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar medio, de mínimo de 3 muestras por grupo en cada etapa estral. ** $p < 0.01$ E1-21 vs. Control.

Contenido de noradrenalina en ganglio celiaco.

Los resultados de la figura 10 muestran una disminución de la cantidad de NA en ganglio celiaco en el grupo E1-21, en los animales sacrificados en estro; no observando el mismo comportamiento en los ganglios de ratas de ratas sacrificadas en la etapa de diestro, donde solo notamos una leve tendencia a que aumente el contenido de noradrenalina en grupo estresado.

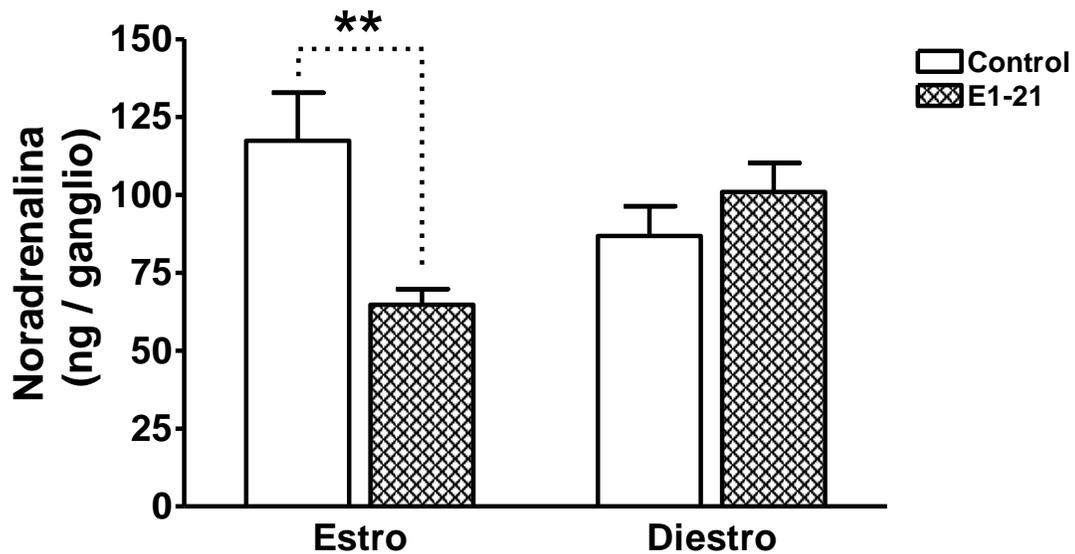


Figura 10: Efecto de estrés prenatal sobre contenido de noradrenalina en ganglio celiaco de ratas. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar medio, de un total de 3 muestras para cada grupo experimental. ** $p < 0,005$ E1-21 vs. Control.

Curva de apertura vaginal de descendencia hembras expuestas a estrés prenatal.

La curva de apertura vaginal nos permitió conocer si dicha apertura se adelantó o retrasó producto del estrés aplicado a la rata madre, verificándose que no se evidenciaron efectos en el grupo estudiado, aunque puede resultar interesante que la apertura comenzó en días diferentes, la tendencia fue a que ambas curvas experimentaran el mismo comportamiento de forma sigmoïdal, llegando el día 37, en forma simultánea, a abrir la totalidad de las ratas su canal vaginal.

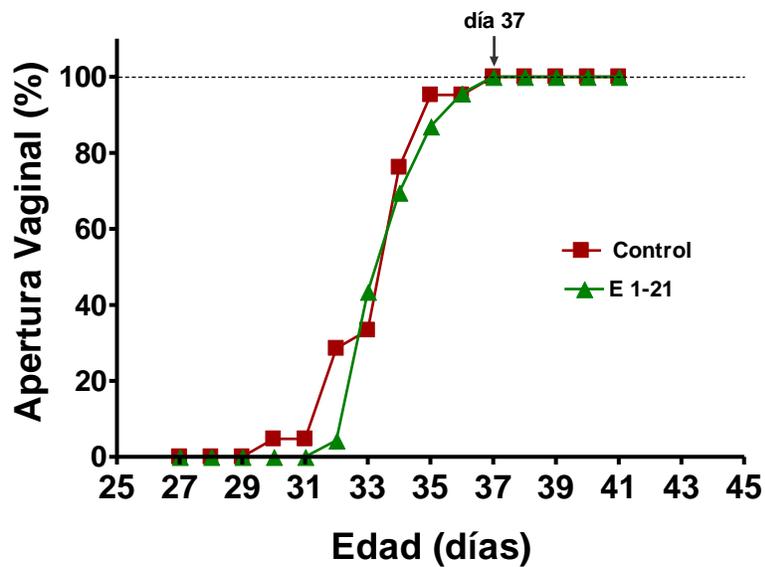


Figura 11: Efecto del estrés prenatal, sobre el porcentaje de ratas mostrando apertura vaginal en función de la edad en el grupo Control (n = 21) y E1-21 (n = 23).

Efecto del estrés prenatal sobre ciclos estrales de las ratas.

Al comparar la ciclicidad de ratas control con ratas estresadas en la etapa de gestación, en porcentajes de los días estudiados en que se encuentran en cada etapa del ciclo estral, no encontramos diferencias entre los grupos analizados en ninguna de las etapas del ciclo (estro 24,5%, diestro (diestro 1 + diestro 2) 60,2% y proestro 15,3%).

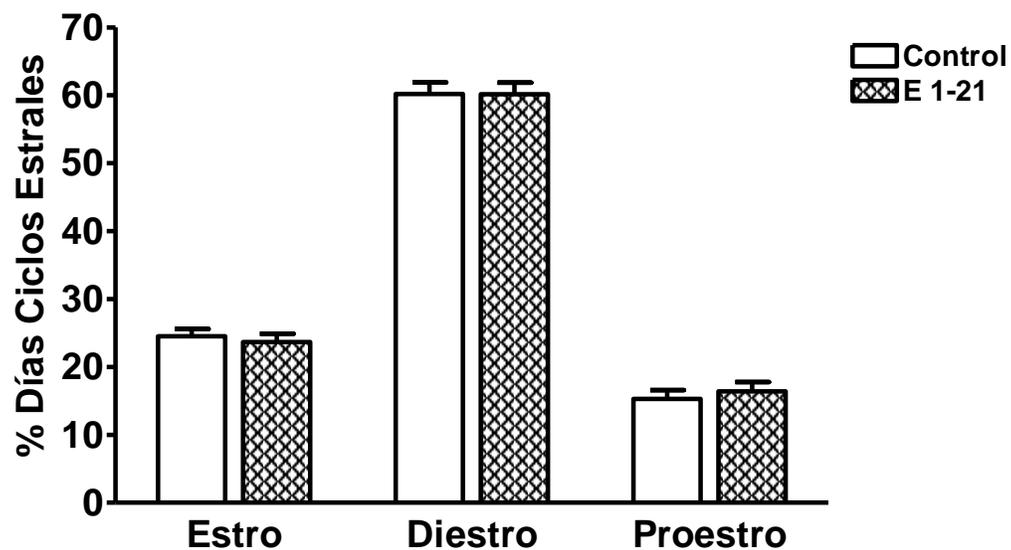


Figura 12: Efecto del estrés prenatal sobre el ciclo estral de las ratas, los datos fueron recopilados entre el día de apertura vaginal y día 61 de vida. Los resultados corresponden al porcentaje de días en los cuales las ratas permanecieron en los diferentes estados del ciclo estral, proestro, diestro (diestro 1 + diestro 2) y estro. Grupo Control (n = 21) y E1-21 (n = 23).

Contenido de noradrenalina en el ovario

El contenido de noradrenalina en los terminales nerviosos que inervan el ovario de ratas sacrificadas durante la etapa de estro, disminuyó en el grupo estresado, en cambio en las ratas eutanasiadas en el periodo diestro se ve una tendencia a incrementar su contenido.

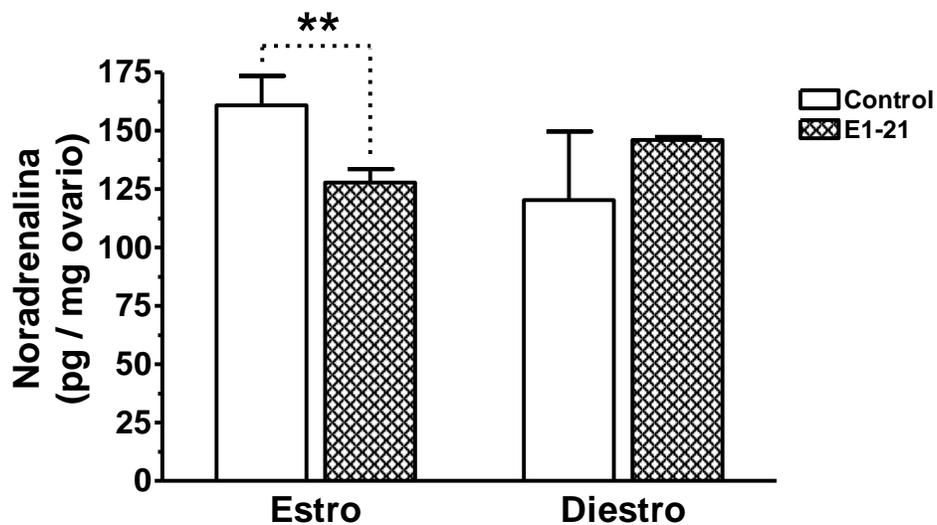


Figura 13: Efecto de estrés prenatal sobre el contenido de noradrenalina en ovario de rata. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 muestras por grupo en cada etapa estral. * $p < 0,001$ E1-21 vs. Control.

Secreción de esteroides ováricos

Secreción espontánea de progesterona

La secreción espontánea de progesterona de los ovarios de las ratas sacrificadas en la etapa estro no fue afectada en lo más mínimo, en cambio en el periodo diestro notamos un significativo incremento de la secreción de la hormona esteroidal analizada.

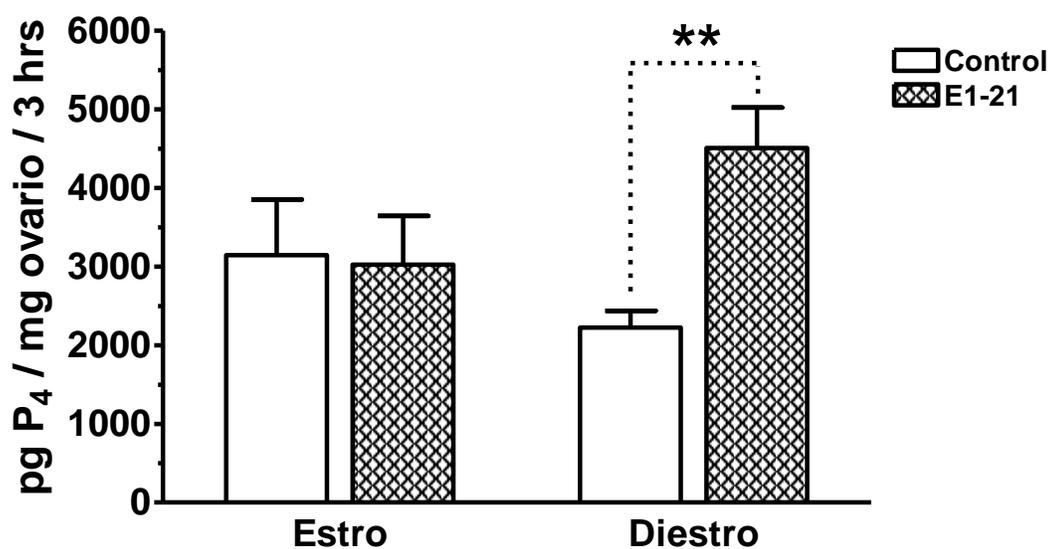


Figura 14: Efecto del estrés prenatal sobre la secreción espontánea de progesterona en ovario en periodo estro y diestro. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 muestras por grupo en cada etapa estral. ** $p < 0,001$ E1-21 vs. Control.

Secreción espontánea de androstenediona.

La secreción espontánea de androstenediona de los ovarios de animales sacrificados en estro disminuyó, no así en etapa diestro, donde el promedio permaneció prácticamente inalterado.

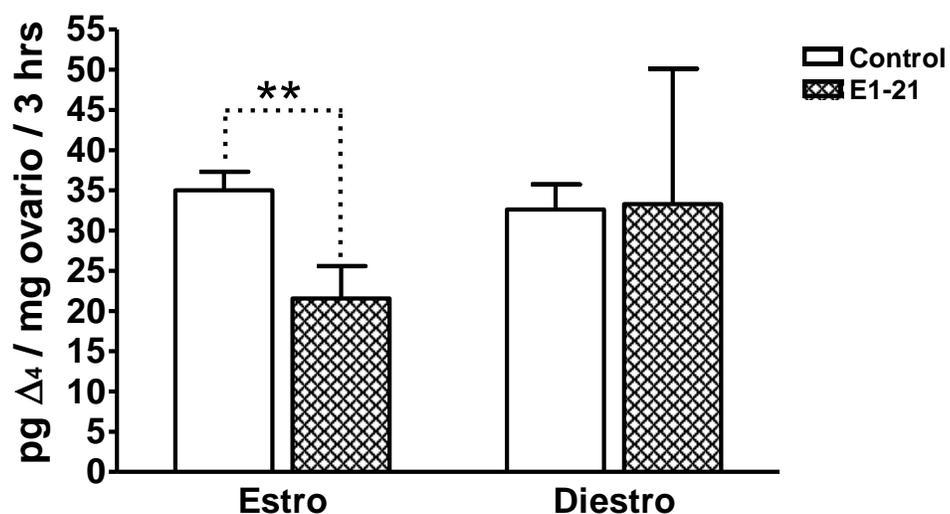


Figura 15: Efecto del estrés prenatal sobre la secreción espontánea de androstenediona en ovarios de animales sacrificados en los periodos de estro y diestro. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 muestras por grupo en cada etapa estral. **p < 0,001 E1-21 vs. Control.

Secreción espontánea de estradiol.

La determinación de la secreción espontánea de estradiol de ovarios de ratas eutanasiadas en etapa estro y diestro, indicó un descenso de dicha cantidad de esteroide en ambas etapas estrales analizadas.

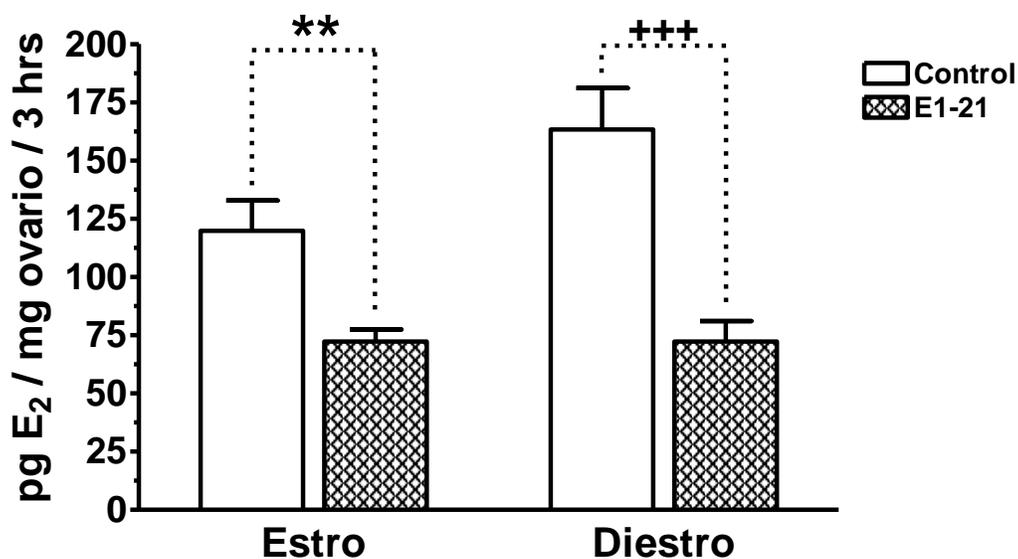


Figura 16: Efecto del estrés prenatal sobre la secreción espontánea de estradiol en ovario de ratas sacrificadas en periodo estro y diestro. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 muestras por grupo en cada etapa estral. ** $p < 0,005$ E1-21 vs. Control, +++ $p < 0,001$ E1-21 vs. Control.

Razón progesterona vs. estradiol (secreción espontánea).

La razón progesterona (P_4) vs. estradiol (E_2) nos indica un aspecto funcional del ovario, puesto que las células de la granulosa que inicialmente secretan principalmente estradiol, al luteinizar secretarán progesterona, así a mayor razón es mayor la función lútea. Los ovarios de los animales del grupo E1-21, sacrificados en estro (después de la ovulación), presentan un incremento en su razón y por ende existe gran funcionalidad lútea. Al observar el periodo diestro (fase luteal tardía) se aprecia el mismo aumento que en estro.

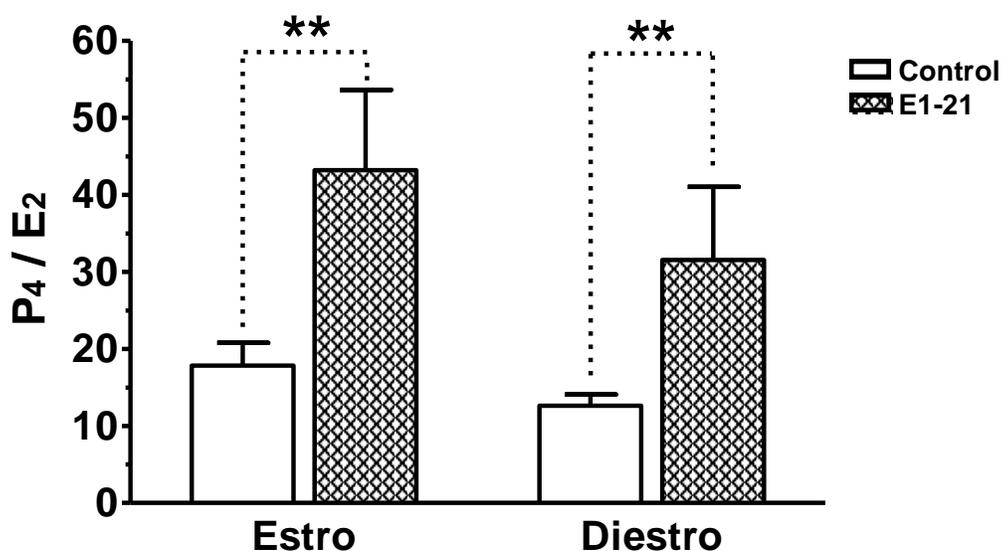


Figura 17: Efecto del estrés prenatal sobre la función lútea del ovario en la secreción espontánea de esteroides. Analizamos dos periodos estrales de las ratas, estro y diestro, con un número mínimo de 3 datos para cada grupo experimental. P_4 y E_2 son pg de esteroides secretados *in vitro* en mg de ovario durante tres horas de incubación. Los valores corresponden al promedio \pm error estándar medio. ** $p < 0,001$ E1-21 vs. Control.

Estudio Morfológico

El análisis morfológico se efectuó de acuerdo al método previamente descrito en materiales y métodos, los siguientes resultados nos indican los cambios observados en la sección mayor del ovario al aplicar estrés en todo el periodo gestacional de la rata:

a.- La observación del número de folículos en la sección mayor del ovario, nos indicó que la cantidad total, folículos sanos y atrésicos, tendió a disminuir en los folículos preantrales así como también en los antrales (figura 18). Al separar los folículos entre sanos (figura 19) y atrésicos (figura 20) se observó que los folículos preantrales sanos experimentaron una leve tendencia a disminuir y por otro lado a aumentar los antrales. El análisis de folículos atrésicos nos mostró una menor cantidad total de folículos atrésicos en el grupo estresado, ésta se debió a la ausencia de folículos preantrales atrésicos además de la caída en los folículos antrales. Dentro de la clasificación de folículos preantrales, realizamos una subclasificación (figura 21), la que nos indicó que el número de primordiales no cambió, los primarios tendieron a disminuir y una mayor tendencia a la disminución observamos en los folículos secundarios, para terminar con la ausencia de folículos atrésicos. Ninguno de estos cambios fue significativo.

b.- Al analizar el porcentaje de folículos por rango de tamaños, es decir porcentaje de distribución folicular, encontramos que en dichos rangos no hay diferencias significativas en el grupo estrés, así al detenernos en el estudio de los folículos antrales sanos (figura 22) notamos tendencias a disminuir o incrementar su porcentaje en los rangos definidos previamente, mismos resultados obtuvimos de los folículos atrésicos (figura 23), destacándose la gran tendencia a disminuir de los encontrados en el rango mayor de 410 μm , además de la poca dispersión de éstos.

c.- El estudio del número de folículos versus tamaños, nos indicó que el grupo estrés no fue modificado significativamente, tanto en el conjunto de folículos sanos (figura 24) como en el de los folículos atrésicos (figura 25), notándose sí algunas tendencias a disminuir y otras a aumentar dicha cantidad de folículos promedios, destacable es que en el rango 310-400 μm en los folículos antrales sanos presentó igual número en las muestras analizadas, motivo por el cuál no hay barra de error. Otro punto a considerar es la tendencia a la disminución de los folículos atrésicos en el rango mayor de 410 μm .

d.- La cuantificación de cuerpos lúteos (figura 26) nos muestra un aumento del número de estas estructuras, alcanzando a ser significativo dicho cambio.

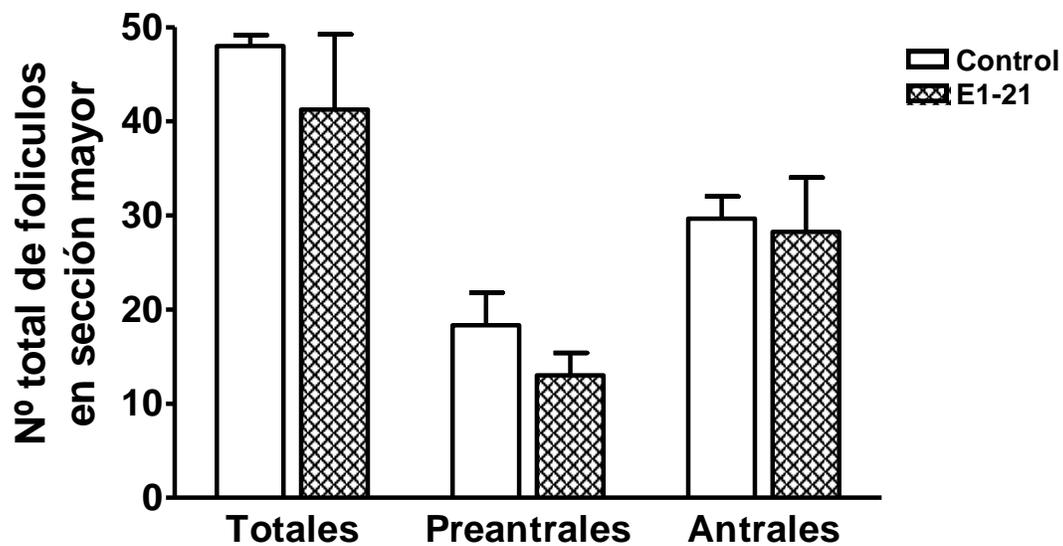


Figura 18: Efecto del estrés, en todo el periodo de la gestación, sobre el número total de folículos en la sección mayor del ovario. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 ovarios para cada grupo experimental.

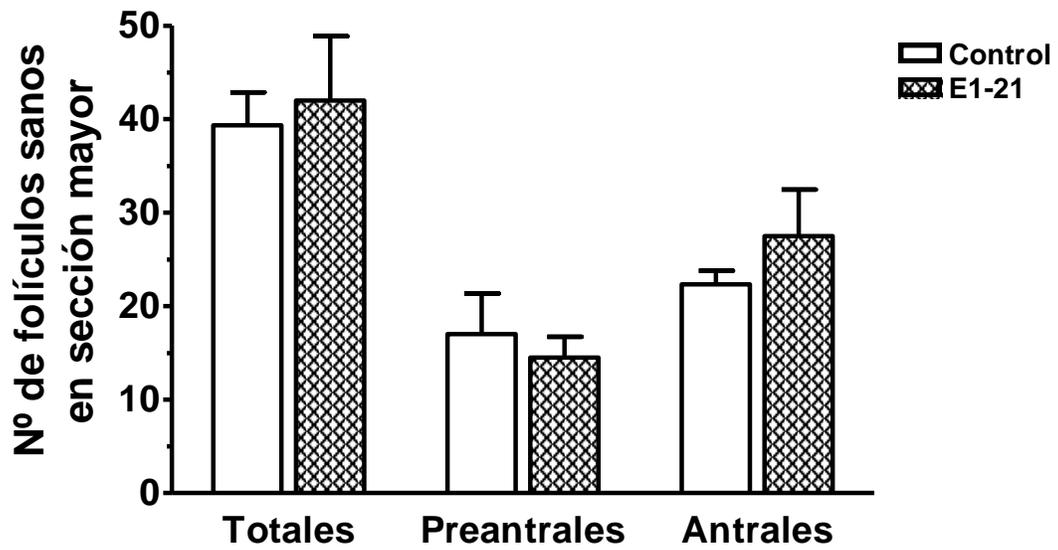


Figura 19: Efecto del estrés, en todo el periodo de la gestación, sobre el número de folículos sanos en la sección mayor del ovario. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 ovarios para cada grupo experimental.

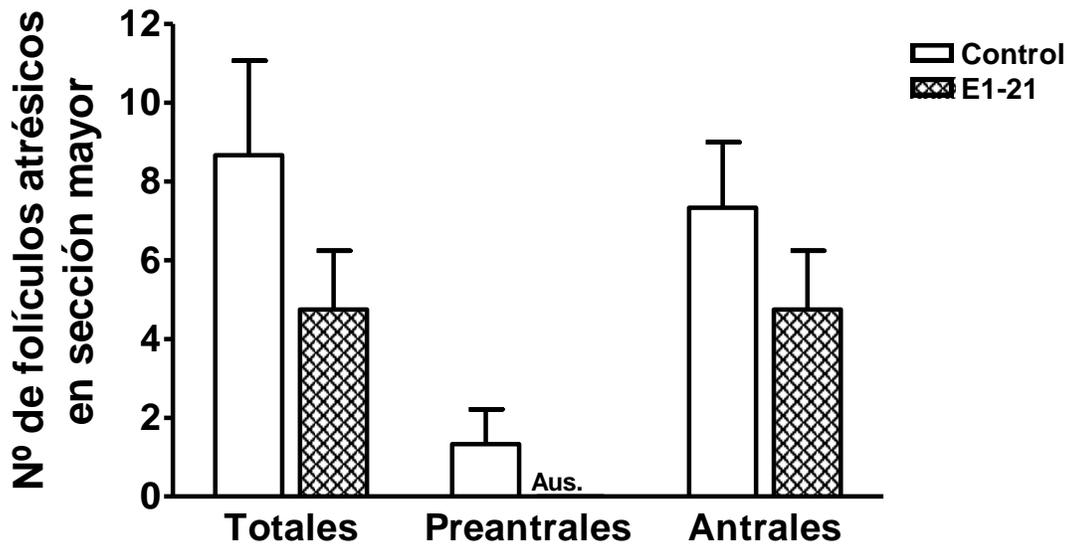


Figura 20: Efecto del estrés, en todo el periodo de la gestación, sobre el número de folículos atrésicos en la sección mayor del ovario. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 ovarios para cada grupo experimental. Aus: ausencia de folículos.

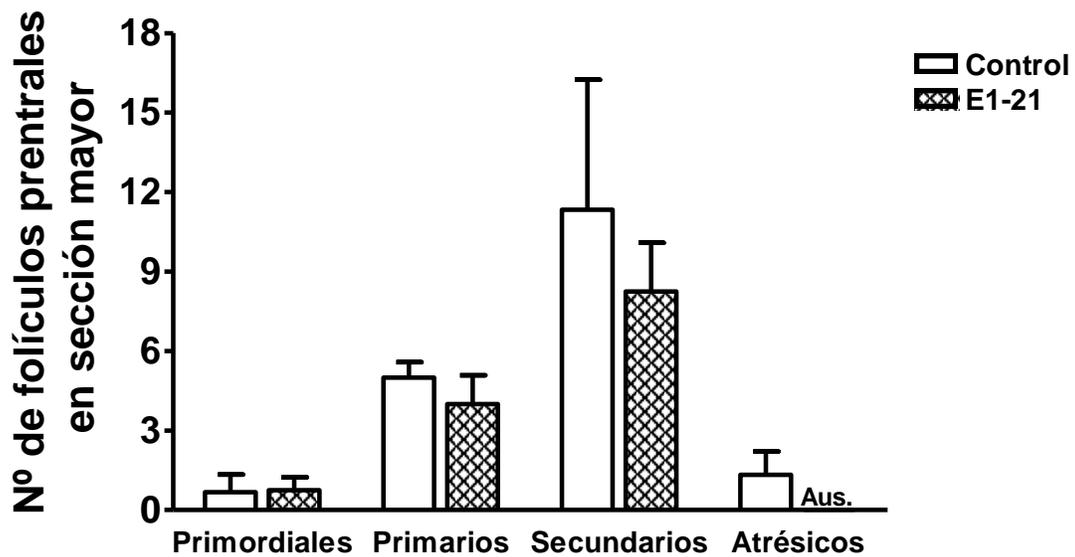


Figura 21: Efecto del estrés, en todo el periodo de la gestación, sobre el número de folículos preantrales en la sección mayor del ovario. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 ovarios para cada grupo experimental. Aus: ausencia de folículos.

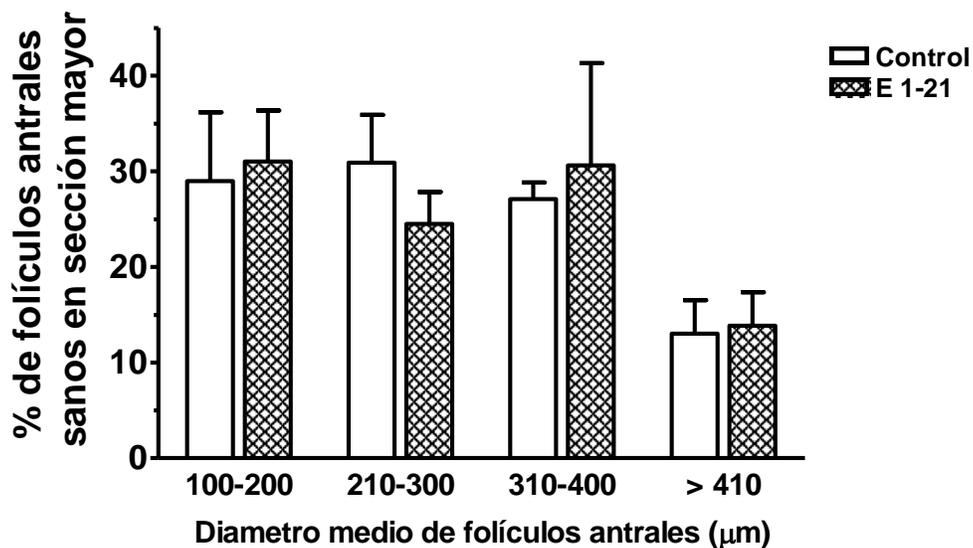


Figura 22: Efecto del estrés, en todo el periodo de la gestación, sobre el porcentaje de distribución de folículos antrales sanos por tamaño en la sección mayor del ovario. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 ovarios para cada grupo experimental.

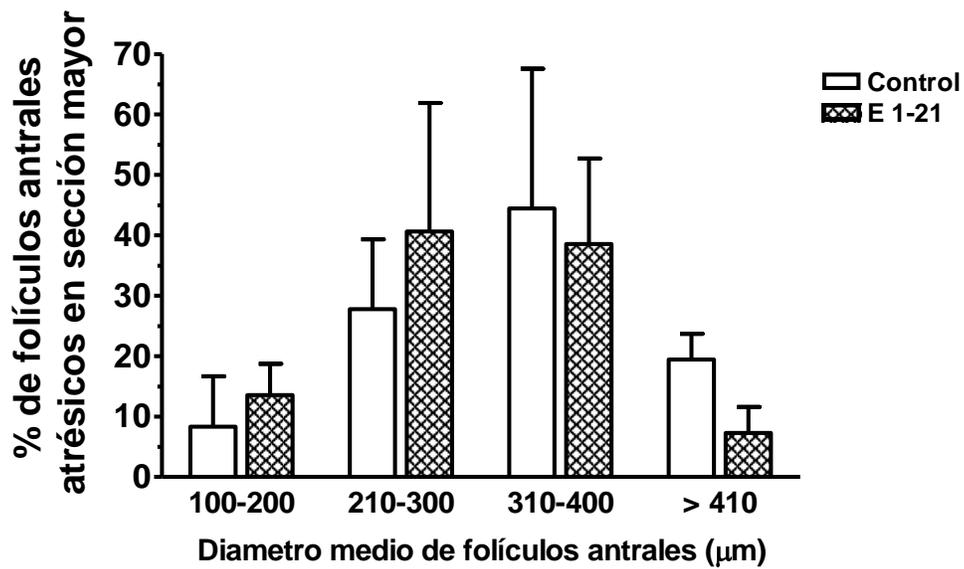


Figura 23: Efecto del estrés, en todo el periodo de la gestación, sobre el porcentaje de distribución de folículos antrales atrésicos por tamaño en la sección mayor del ovario. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 ovarios para cada grupo experimental.

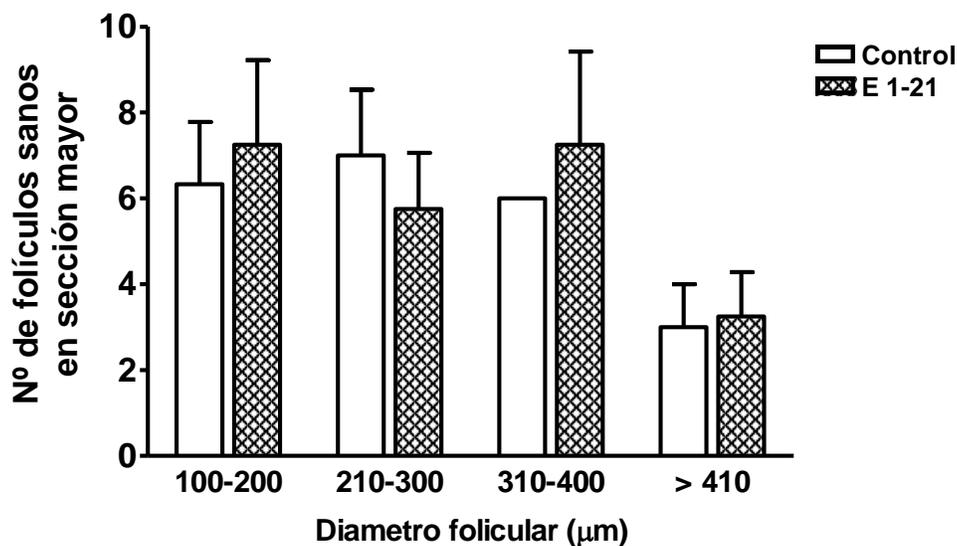


Figura 24: Efecto del estrés, en todo el periodo de la gestación, sobre el número de folículos antrales sanos por tamaño en la sección mayor del ovario. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 ovarios para cada grupo experimental.

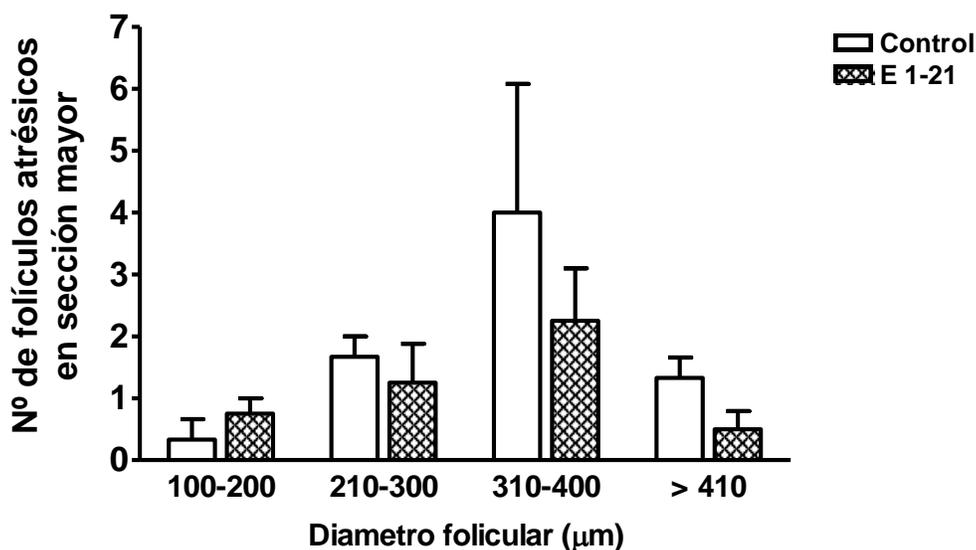


Figura 25: Efecto del estrés, en todo el periodo de la gestación, sobre el número de folículos antrales atrésicos por tamaño en la sección mayor del ovario. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 ovarios para cada grupo experimental.

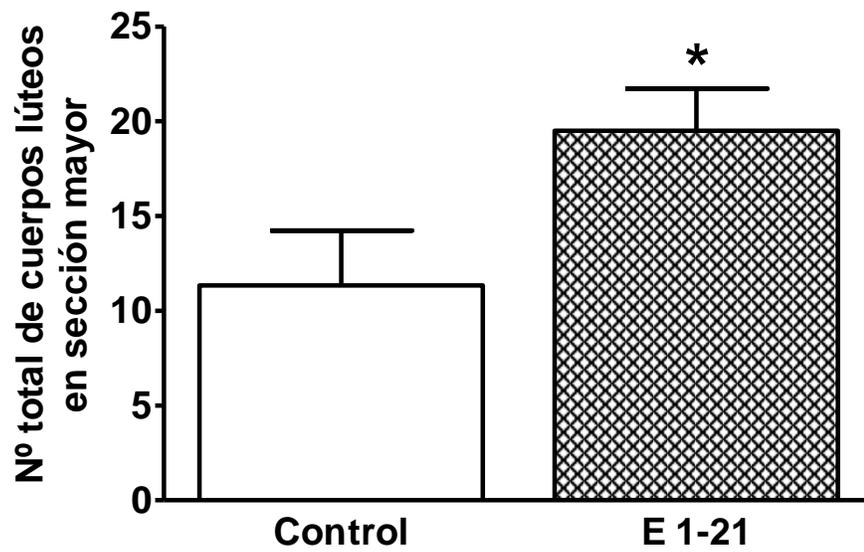


Figura 26: Efecto del estrés, en todo el periodo de la gestación, sobre el número total de cuerpos lúteos en la sección mayor del ovario. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de un mínimo de 3 ovarios para cada grupo experimental. * $p < 0,05$ E1-21 vs. Control.

DISCUSIÓN.

El estrés, dependiendo de su tipo e intensidad, es capaz de desencadenar cambios en la fisiología de los sistemas vivos. En esta memoria lo hemos utilizado para analizar como afecta la descendencia de la rata, cuando éste es aplicado en el periodo de la gestación de las mismas.

El nuestro, no ha sido el primer grupo de laboratorio que se ha enfrentado al desafío de analizar los cambios que experimenta la descendencia cuando la progenitora es estresada. Así, podemos citar los estudios de Barbazanges (Barbazanges *et al.*, 1996) que trabajó con estrés de restricción prenatal, notando alterado el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) o Guo (Guo *et al.*, 1993) que estresó ratas preñadas mediante nado en agua fría en diversas etapas de la gestación, observando cambios en la tasa de mortalidad neonatal. Lo novedoso de este estudio es que escogimos un estrés de tipo físico, como es el de frío para ver los cambios que se expresan en las ratas adultas. La elección del estrés por frío fue debido a que con este se estimula la inervación simpática que llega al ovario y no se altera la liberación de glucocorticoides (Bhatnagar *et al.*, 1995), ya que dichas sustancias atraviesan la barrera placentaria pudiendo interferir en el desarrollo del eje HHA de las ratas neonatas. Los primeros resultados que obtuvimos nos indicaron que el tiempo de gestación fue el mismo en los dos grupos estudiados, además vimos que nacieron más crías machos que hembras con el estrés prenatal aplicado. Al analizar individualmente las camadas notamos que, porcentualmente, el grupo control presentó un mayor porcentaje de nacimiento de hembras, pero obtuvimos resultados opuestos en las camadas expuestas al estrés durante todo el periodo de la gestación, ya que nacieron más machos. Estos resultados difieren de los obtenidos por Guo (Guo *et al.*, 1993) donde el estrés de nado en agua fría de las madres preñadas no afectó el número de neonatos de un determinado sexo. Para estos resultados no tenemos explicación concreta, ya que el estrés por frío puede haber afectado desde la motilidad de espermatozoides, la fecundación, transporte del ovocito fecundado a través del oviducto para llegar a las trompas uterinas y finalmente la implantación, e incluso después de esto pudo haber reabsorción de los embriones o problemas en el desarrollo que llevaron a abortos no evidentes.

El análisis de la ganancia de peso de las crías hembras, desde el momento del nacimiento hasta la eutanasia, no mostró diferencias entre los grupos experimentales observados, lo que

solo nos permite sugerir que los requerimientos energéticos y la ingesta no cambió entre los diferentes grupos a lo largo del tiempo de vida de las ratas estudiadas. Este punto es importante ya que muchos agentes estresantes pueden modificar el peso al nacer lo que cambia posteriormente las curvas de ganancia de peso de los neonatos.

La observación de la concentración de monoaminas y sus metabolitos en hipotálamo nos muestra como está la actividad neuronal, (Castro *et al.*, 2001) esto es la comparación de la cantidad de neurotransmisor secretado versus lo recaptado, para posteriormente ser metabolizado en el citoplasma del terminal presináptico. A mayor cantidad de metabolito de monoaminas frente a menor cantidad de neurotransmisor, mayor es la actividad o el recambio neuronal, esta información es útil, puesto que la regulación de la función ovárica depende de la interacción de variados mecanismos neuroquímicos que involucran el hipotálamo, la glándula pituitaria y el ovario (Paredes *et al.*, 1998), conociendo que la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) junto a las hormonas esteroidales secretadas por el ovario, regulan la secreción de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) a nivel de la pituitaria anterior; además la secreción de GnRH es regulado por neurotransmisores, los cuales cambian durante los ciclos estrales de la rata (Carr *et al.*, 1980), así el análisis de hipotálamos de ratas eutanasiadas en dos periodos diferentes del ciclo estral como es estro y diestro, nos permitió analizar dicha actividad neuronal después de la ovulación (post elevación del pico de LH) y antes de la ovulación (previo al pico de LH) en diestro.

Que la cantidad promedio de neurotransmisores hipotalámicos, en estro, experimentara una pequeña tendencia a incrementarse y sus respectivos metabolitos permanecieran prácticamente inalterados, nos dice que dejando de lado la gran dispersión del error, la actividad neuronal disminuyó en el grupo estresado para ambas monoaminas. Al efectuar el análisis de monoaminas y sus metabolitos en etapa diestro, notamos que los neurotransmisores tendieron a disminuir, resultando significativo este descenso para dopamina (DA); lo que implicó que la actividad dopaminérgica aumentó. Para el caso de serotonina (5HT) y su metabolito ácido 5-hidroxiindol acético (5-HIAA) encontramos que la tendencia a que se incremente 5-HIAA puede deberse a que se secretó más 5-HT, la que fue metabolizada a 5-HIAA por la enzima monoamino oxidasa (MAO A) en el citoplasma del terminal presináptico, sin haberse incrementado su síntesis.

Por otro lado que la totalidad de las camadas abrieran su canal vaginal el día 37 de vida, a pesar de que este se inició y transcurrió en diferentes días, no en paralelo, nos indica que el estímulo aplicado no modificó la programación de la apertura. Al analizar detalles como que el día 32 el 29 % del promedio del grupo control ya había abierto su canal vaginal vs. el 4,8 % de las estresadas durante la gestación, se debe a que el día 32 un número de 6 ratas del grupo control habían abierto su canal y el mismo día solo una rata del grupo estresado abrió, lo que no resultó trascendente, puesto que al transcurrir los días el número de ratas que presentaban apertura vaginal tendió a igualarse hasta llegar al día 37, donde ambos grupos alcanzaron dicha apertura en forma simultánea. Ahora, al asociar los cambios en la actividad monoaminérgica en el hipotálamo, nos encontramos que no se reflejaron en la ciclicidad estral de las ratas, como podríamos haber esperado, producto de la importancia de la actividad dopaminérgica en la regulación del pico de LH previo a la ovulación. Así los frotis vaginales nos mostraron la no variación del grupo estresado, lo que nos indica que al igual que en el caso anterior, ahora la programación *in útero* del patrón de ciclos estrales no fue modificado con el estímulo estresante aplicado durante la gestación.

Sin embargo, en otro órgano que responde directamente al estrés como es la glándula suprarrenal, apareció una evidente disminución, que se manifestó claramente en los animales sometidos a estrés durante todo el periodo de gestación y en forma independiente del ciclo estral. Posiblemente una o todas las enzimas involucradas en la biosíntesis de las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) (Kumer y Vrana, 1996) en las células cromafines de la médula adrenal, tienen una menor expresión o actividad, como lo encontró Martins (Martins *et al.*, 2004); además, como conjetura, al presentar menor contenido de catecolaminas adrenales, dichos animales pueden presentar un umbral más alto para responder a estímulos estresantes, esto es que necesitan una mayor intensidad del estímulo estresor para liberar una cantidad determinada de catecolaminas de la médula adrenal.

El ganglio celiaco y el ovario están directamente relacionados, puesto que del primero se proyectarán las fibras nerviosas hacia el ovario, donde en los terminales nerviosos se produce la descarga de noradrenalina (NA) hacia el ovario. Pero el contenido de neurotransmisor a nivel ovárico está determinado por más factores que la síntesis, ya que la liberación y recaptación al terminal nervioso son también importantes. De esta forma la disminución del contenido de NA en ganglio celiaco y la correspondiente disminución de la

concentración de NA en ovario en ratas eutanasiadas en etapa estro, se puede deber a la disminución de la síntesis o que aumentó la liberación de neurotransmisor. Para comprobar que la síntesis fue afectada basta con determinar la expresión y/o la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH); pero también cabe la segunda posibilidad de que la menor cantidad se deba al aumento de la liberación de NA, para lo cuál debería realizarse experimentos con liberación de ^3H -NA en ovario, y si pudiera identificarse de mejor forma, realizar el mismo experimento en ganglio celiaco. El análisis efectuado ahora en ratas sacrificadas en etapa diestro, nos mostró una tendencia a incrementar la cantidad en ambas estructuras, lo que puede deberse a que aumentó la síntesis o disminuyó la liberación de NA en las estructuras analizadas, para comprobar si se trata de uno u otro proceso el que fue afectado necesitamos realizar los mismos experimentos sugeridos para la etapa estro.

Al comparar los resultados del contenido ovárico de NA y secreción espontánea de esteroides, estamos relacionando indirectamente la estimulación catecolaminérgica de receptores β_2 con la síntesis ovárica de esteroides, de esta forma los primeros resultados que obtuvimos de secreción de progesterona (P_4), de ovarios de ratas eutanasiadas en etapa estro, nos indicaron que la menor estimulación por NA no tuvo efectos en la secreción de P_4 , pero si notamos una disminución en la secreción de androstenediona (Δ_4) y de estradiol (E_2), la posible explicación es que en dicho periodo estral según Ferruz (Ferruz *et al.*, 1991) hay una menor cantidad de receptores catecolaminérgicos de tipo β_2 , los que son estimulados por catecolaminas, las que provienen de la inervación que llega a las células de la teca en el folículo (Aguado *et al.*, 1982), para producir P_4 y Δ_4 (Ojeda *et al.*, 2000), pero también P_4 es producido por células de granulosa, así sugerimos que la secreción de P_4 en esta etapa se ha independizado de la estimulación; en cambio que la secreción de los otros dos esteroides ováricos hayan descendido en paralelo con el contenido de NA ovárico se debe a la directa estimulación de las células de la teca, puesto que a menor estimulación por NA, menor síntesis de Δ_4 , lo que es el sustrato para E_2 en las células de la granulosa, se refleja en la menor síntesis de E_2 para la secreción espontánea *in vitro*.

Al efectuar la razón P_4 v/s. E_2 determinamos la función lútea del ovario, considerando que el número de células no cambió, esto es que cada célula de granulosa se luteinizó para formar las células lúteas, el aumento en la razón sugirió que existiría un aumento en el número de cuerpos lúteos y/o en la vida media de ellos, lo que se confirmó al analizar el

número de cuerpos lúteos en el ovario en el cual se visualizó un aumento en su cantidad. Lo que es dilucidado con la ausencia de la variación de la capacidad de secreción de progesterona, llevándonos a interpretar que la vida media de los cuerpos lúteos ha aumentado.

Al relacionar el contenido total de NA, la cuál tendió a disminuir en E1-21, y el número total de folículos en la sección mayor del ovario, encontramos una tendencia a la disminución debido principalmente a la caída del número de folículos preantrales, específicamente de tipo primario y secundario. Al analizar el efecto sobre la atresia notamos que también tendió a disminuir el número de folículos totales en el grupo E1-21, debido a la ausencia de preantrales y descenso en los antrales. El análisis del diámetro medio de folículos antrales nos muestra una tendencia similar a la encontrada por Lara (Lara *et al.*, 1990), quienes realizaron desnervación simpática de ovarios por tratamiento crónico con guanetidina y observaron una tendencia a aumentar los folículos antrales entre 100-200 μm y 210-300 μm . Esto se traduce además a que ocurre una disminución en el porcentaje de folículos de mayor tamaño. Entonces se puede concluir que -aunque se realizó el análisis morfológico solo en los cortes de ovario correspondientes a la zona central, lo que limita un poco la interpretación- la disminución en el contenido de NA del ovario provocada por el estrés prenatal, produjo cambios en el desarrollo folicular que son similares a los observados en animales neonatos a los cuales se priva de innervación simpática, indicando la importancia de la estimulación simpática del ovario en el desarrollo folicular, mas aún cuando esta es programada *in útero*.

Los resultados que obtuvimos de ovarios de ratas eutanasiadas en etapa diestro, fueron diferentes al otro periodo estral analizado, lo que era esperado, puesto que en este periodo la rata ha ovulado y se prepara para la siguiente ovulación, con todos los cambios esteroidales que se esperan; de esta forma la tendencia a que aumentara el contenido de NA en el ovario se reflejó en una mayor estimulación adrenérgica (Aguado *et al.*, 1982), principalmente en células de la teca, esto sumado al hecho que en etapa diestro existen más receptores β_2 que en las otras etapas del ciclo estral de la rata (Ferruz *et al.*, 1991), así esto permite explicar el gran incremento en la cantidad de P_4 secretada, con este resultado lo esperado es que los esteroides producto de P_4 , Δ_4 y E_2 , estuvieran también aumentados, pero no fue así, ya que Δ_4 no cambió y E_2 disminuyó ostensiblemente, lo que es atribuible a

algún efecto en la regulación enzimática de su síntesis en etapa estral diestro, lo que nos aproxima a considerar el descenso en la actividad monoaminérgica hipotalámica y dicha baja en la secreción de estradiol lo que resulta atribuibles a efectos inesperados del estrés aplicado sobre la madre.

CONCLUSIONES.

El estrés aplicado a la rata madre, durante los 21 días de la gestación, provocó más nacimientos de machos que de hembras, no afectando el desarrollo postnatal de las mismas.

La disminución de la actividad monoaminérgica en hipotálamo se asoció a los cambios encontrados en el control de la función ovárica y se relaciona con una disminución catecolaminérgica en las diferentes estructuras analizadas.

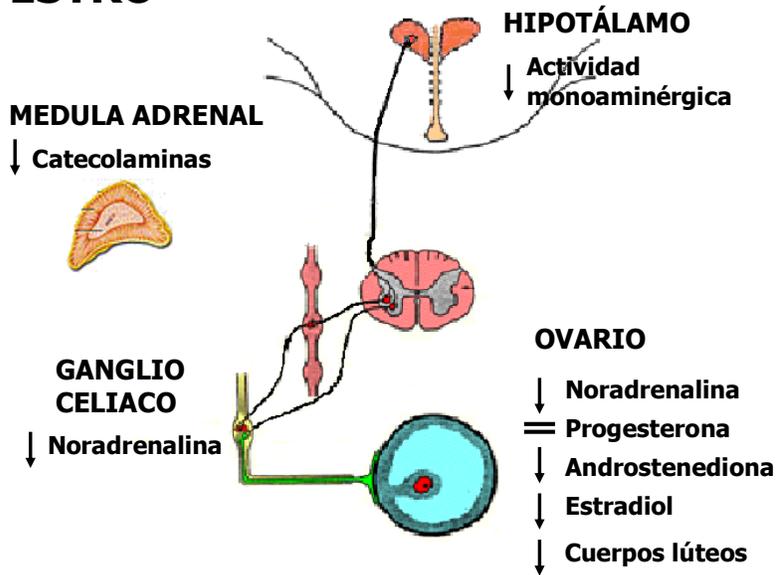
El menor contenido de noradrenalina en el ovario, en periodo estro, debido a una menor estimulación simpática provocó una menor secreción de hormonas esteroidales.

El aumento en el número de cuerpos lúteos indicó un incremento en la fase lútea, lo que concuerda con el aumento en la función lútea.

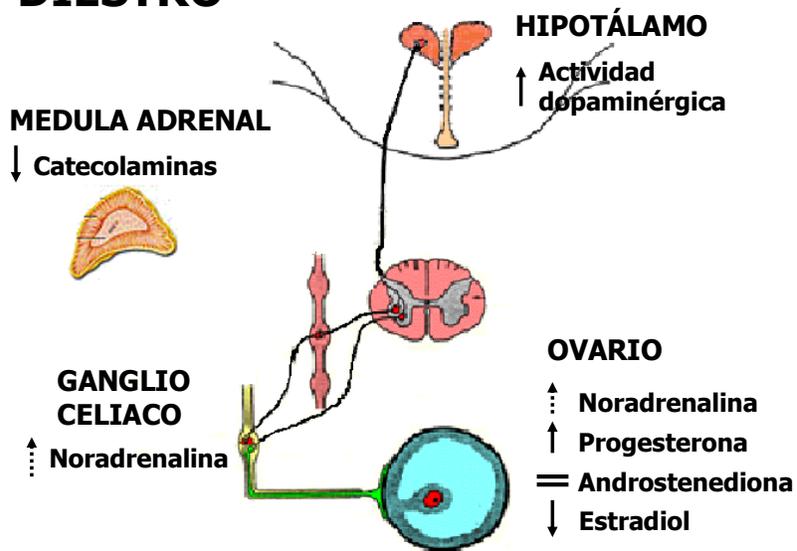
El periodo diestro, por ser una etapa más dilatada en el tiempo, y menos clara presentó cambios menos evidentes.

Para finalizar, el modelo de estrés físico sobre la rata preñada durante toda la preñez, demostró ser efectivo para modificar el control y la función ovárica en las ratas hijas en la etapa adulta.

ESTRO



DIESTRO



SIMBOLOGÍA:

- ↑ Aumenta
- ↓ Disminuye
- ↑: Tiende a aumentar
- ↓: Tiende a disminuir
- = No hay variación

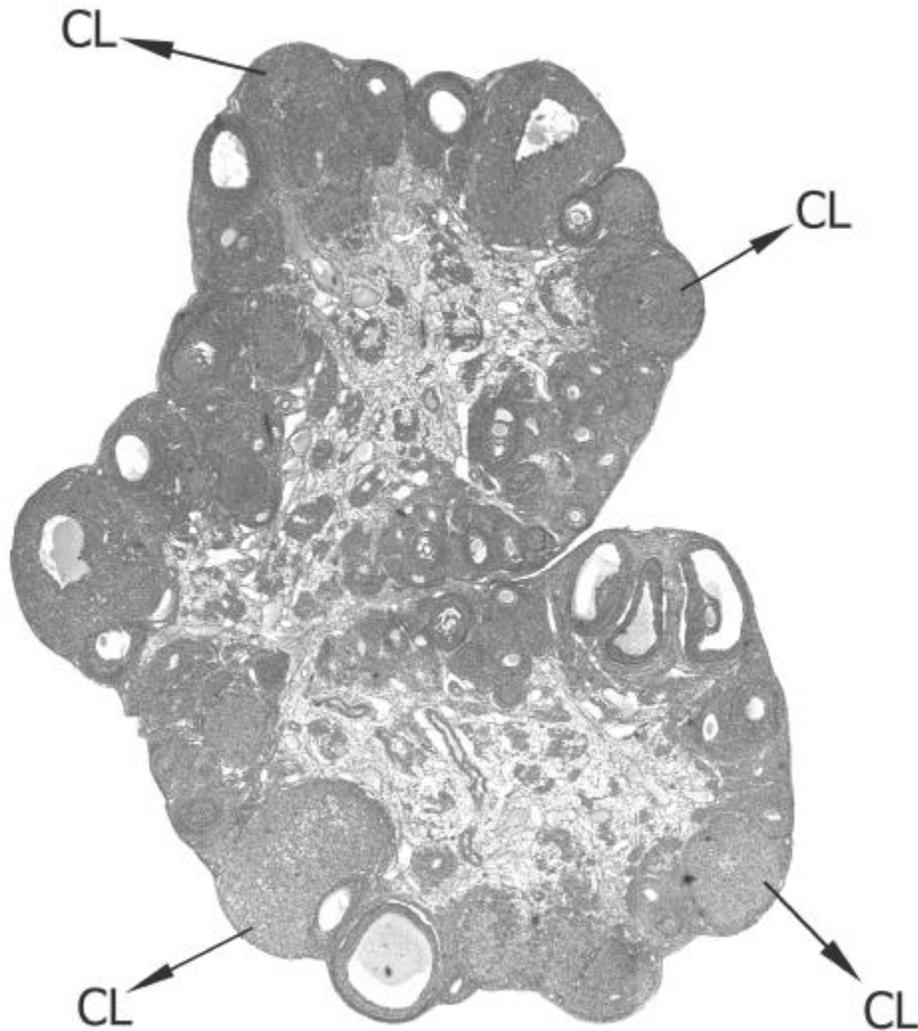
REFERENCIAS

1. AGUADO LI, PETROVIC SL AND OJEDA SR. Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. Endocrinology. 110(4):1124-32. 1982
2. BARBAZANGES A, PIAZZA PV, LE MOAL M, MACCARI S. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. J. Neurosci. 16(12):3943-49. 1996
3. BARKER DJP. Mothers, babies and disease in later life. 2nd ed. Edinburgh: Churchill Livingstone. 1998. pp.46-50,187-8.
4. BARRIA A, LEYTON V, OJEDA SR, LARA HE. Ovarian steroidal response to gonadotropins and, β -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. Endocrinology. 133:2696-2703. 1993
5. BHATNAGAR S., MITCHELL J.B., BETITO K., BOKSA P. AND MEANEY M.J. Effects of chronic intermittent cold stress on pituitary adrenocortical and sympathetic adrenomedullary functioning. Physiol. Behav. 57(4):633-9. 1995
6. CARR, AL. Catecholamines synthesizing enzymes in the hypothalamus during the estrus cycle. Brain Res. 196: 437-45. 1980
7. CASTRO M., AYALA M., MONROY J., CHAVIRA R., DAMIÁN-MATSUMURA P. AND DOMÍNGUEZ R. Changes in monoaminergic activity in the anterior, medium and posterior hypothalamus, gonadotropins levels and ovarian hormones during puberty of the female rat. Brain. Res. Bull. 54(4): 345-52. 2001
8. CHI JD, ODONTIADIS J AND FRANKLIN M. Simultaneous determination of catecholamines in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography. Journal of Chromatography B. 731:361-67. 1999
9. DORFMAN M. La activación nerviosa simpática inducida por estrés frío modifica el desarrollo folicular ovárico: participación del factor de crecimiento nervioso. Memoria para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 2001. 41 h.
10. EVERETT F., Pituitary and hypothalamus: perspectives and overview. In: Knobil E.; Neil, J., eds. The physiology of reproduction. New York: Plenum Press; 1994: 1509-21.
11. FERRUZ J., BARRIA A., GALLEGUILLOS X. AND LARA HE. Release of norepinephrine from the rat ovary: local modulation of gonadotropins. Biol. Reprod. 45(4):592-7. 1991

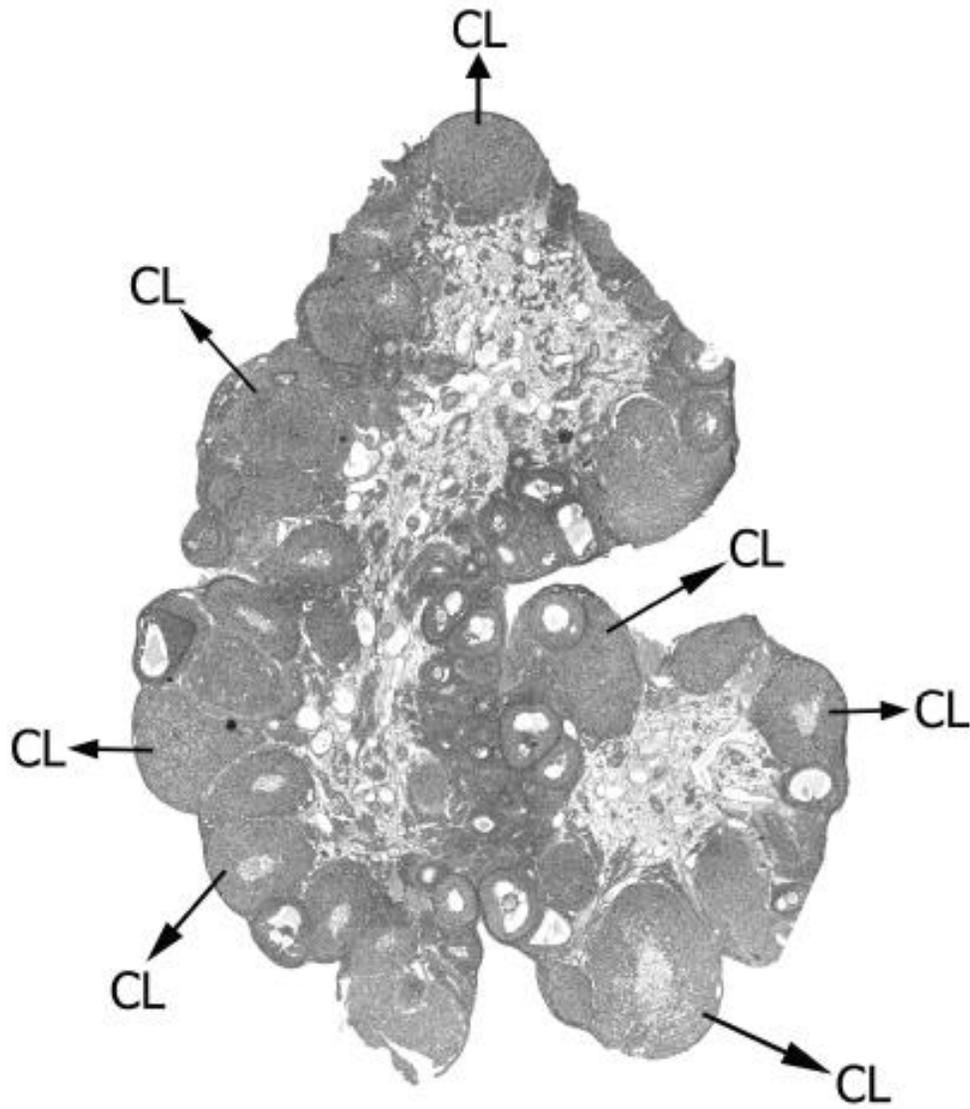
12. GÁLVEZ A., PAREDES A., FIEDLER J., VENEGAS M. AND LARA H. (1999). Effect of adrenalectomy on the stress-induced changes in ovarian sympathetic tone in the rat. Endocrine. 10:131-5. 1999
13. GERANDAI I, TÓTH I, BOLDOGKÖI Z, MEDVEZKY I AND HALÁSZ B. Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. Neuroendocrinology. 68:244-56. 1998
14. GOUGEON A. Dynamics of human follicular growth: morphologic, dynamic, and functional aspects. In *The Ovary*, 2d ed., Leung P.C.K. and Adashi E.Y. (eds). San Diego: Elsevier. 25-43. 2004
15. GUO A, NAPPI RE, CRISCUOLO M, FICARRA G, AMRAM A, TRENTINI GP, PETRAGLIA F. AND GENAZZANI AR. Effect of chronic intermittent stress on rat pregnancy and postnatal development. Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 51(1):41-5. 1993
16. KAWAKAMI M, KUBO K, UEMURA T, NAGASE M AND HAYASHI R. Involvement of ovarian innervation in steroid secretion. Endocrinology. 109(1):135-45. 1981
17. KUMER SC AND VRANA KE. Intricate regulation of tyrosine hydroxylase activity and gene expression. J. Neurochem. 67:443-62. 1996
18. KVETNANSKÝ R, FUKUHARA K, PACÁK K, CIZZA G, GOLDSTEIN DS AND KOPIN IJ. Endogenous glucocorticoids restrain catecholamine synthesis and release at rest and during immobilization stress in rats. Endocrinology. 133(3): 1411-19. 1993
19. KVETNANSKÝ R, PACÁK K, FUKUHARA K, VISKUPIC E, HIREMAGALUR B, NANKOVA B, GOLDSTEIN DS, SABBAN EL, KOPIN IJ. Sympathoadrenal system in stress: interaction with the hypothalamic-pituitary-adrenocortical system. Ann. N. Y. Acad. Sci. 771:131-58. 1995
20. LARA HE, MCDONALD JK, AHMED CE, OJEDA SR. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. Endocrinology. 127(5):2199-209. 1990
21. LARA HE, DISSEN GA, LEYTON V, PAREDES A, FUENZALIDA H, FIEDLER JL AND OJEDA SR . An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steroid-induced polycystic ovary in the rat. Endocrinology. 141:1059-72. 2000

22. LARA HE, DORFMAN M, VENEGAS M, LUZA SM, LUNA SL, MAYERHOFER A, GUIMARAES MA, ROSA E SILVA AAM AND RAMIREZ VD. Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: studies on norepinephrine release. Micros. Res. Tech. 15:495-504. 2002
23. LOWRY OH, ROSEBROUGH NJ, FARR AL AND RANDALL RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193(1):265-75. 1991
24. LUZA SM, ARANCIBIA SM, VENEGAS M AND LARA HE. Thyrotropin-releasing hormone as a mediator of the central autonomic pathway controlling ovarian function. Neuroendocrinology. 77:273-81. 2003
25. MARTINS AC, SOUZA KL, SHIO MT, MATHIAS PC, LELKES PI, GARCIA RM Adrenal medullary function and expression of catecholamine-synthesizing enzymes in mice with hypothalamic obesity. Life Sci. 74(26):3211-22. 2004
26. MUELLER RA, THOENEN H AND AXELROD J. Adrenal tyrosine hydroxylase: compensatory increase in activity after chemical sympathectomy. Science 163:468-9. 1969
27. OJEDA S R. Female Reproductive Function. In: Griffin, J. and Ojeda, S. R. Textbook of endocrine physiology. 4th ed., Oxford: University Press. 2000. 202-342.
28. PACAK K, PALKOVITS M, YADID G, KVETNANSKÝ R, KOPIN IJ AND GOLDSTEIN DS. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. Am. J. Physiol. 275: R1247-R1255. 1998
29. PAREDES A. Efecto del estrés sobre la regulación simpática en la función ovárica. Memoria para optar al título de Bioquímico, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile. 1993. 51 h.
30. PAREDES A, GÁLVEZ A, LEYTON V, ARAVENA G, FIEDLER JL, BUSTAMANTE D AND LARA HE. Stress promotes development of ovarian cyst in rats. Endocrine. 8(3):309-15. 1998
31. VON EULER US AND HAMBERG U. Colorimetric estimation of noradrenalin in the presence of adrenalin. Science. 110:561. 1949

ANEXOS



Anexo 1: Imagen de corte central de ovario de rata control en estro. Se destaca los cuerpos lúteos (CL). Cortes de 8 μ m, teñidos con hematoxilina eosina. Amplificación 40X.



Anexo 2: Imagen de corte central de ovario de rata grupo E1-21 en estro. Se destaca los cuerpos lúteos (CL). Cortes de 8 μm , teñidos con hematoxilina eosina. Amplificación 40X.