

# **UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS  
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

“DESNUTRICIÓN PRENATAL EN LA RATA: EFECTO EN LA  
CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DEL FACTOR LIBERADOR  
DE CORTICOTROPINA Y EN LA ACCIÓN DE  
DEXAMETASONA SOBRE LA CORTICOSTERONA SÉRICA A  
LOS 40 DÍAS DE EDAD”

**MARIO NAVARRETE RIOBÓ**

Memoria para optar al Título  
Profesional de Médico Veterinario.  
Departamento de Ciencias  
Biológicas Animales.

**PROFESOR GUÍA: SR. HERNÁN PÉREZ TORREJÓN**

**SANTIAGO, CHILE**

**2007**

# INDICE

I. Introducción.....	7
II. Revisión Bibliográfica.....	10
1-. Desnutrición prenatal, enfermedades de la vida adulta y programación fetal.....	10
2-. Inducción del retardo en el crecimiento intrauterino y consecuencias postnatales...10	
3-. Glucocorticoides, barrera placentaria y desnutrición prenatal.....	12
4-. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), CRH y Corticosterona.....	14
5-. Glucocorticoides y programación fetal del eje HHA.....	15
6-. CRH, sistemas noradrenérgicos centrales e hipertensión arterial.....	16
III. Hipótesis.....	19
IV. Objetivos.....	19
1-. Objetivo general.....	19
2-. Objetivos específicos.....	19
V. Materiales y Métodos.....	20
1-. Animales.....	20
2-. Tratamiento dietario de progenitoras (modelo de desnutrición prenatal).....	21
3-. Tratamiento con dexametasona.....	23
4-. Medición de presión arterial sistólica y diastólica.....	24
5-. Cuantificación de la concentración plasmática CRH mediante RIA.....	25
5.1-. Toma de muestras.....	25
5.2-. Tratamiento de las muestras de plasma.....	26
5.3-. Protocolo del kit RIA específico para CRH de rata.....	27
5.4-. Cálculo del resultado.....	30
6-. Cuantificación de la concentración sérica de corticosterona.....	32
6.1-. Toma de muestras.....	32
6.2-. Protocolo de kit RIA específico para Corticosterona.....	32
6.3-. Cálculo del resultados.....	35

7-. Análisis estadístico.....	36
7.1-. Presión arterial.....	36
7.2-. Concentración plasmática de CRH.....	36
7.3-. Concentración sérica de corticosterona.....	37
VI. Resultados.....	38
1-. Peso corporal de las ratas gestantes.....	38
2-. Peso corporal de las crías.....	39
3-. Presión arterial.....	41
4-. Concentración plasmática de CRH.....	42
5-. Efecto de la dexametasona en la concentración sérica de corticosterona.....	43
VII. Discusión.....	44
VIII. Conclusiones.....	49
IX. Bibliografía.....	50

## RESUMEN

Estudios epidemiológicos realizados en humanos han mostrado que un crecimiento intrauterino alterado está asociado con un incremento de la incidencia de patologías cardiovasculares, metabólicas y otras enfermedades no transmisibles en la vida adulta. En mamíferos, la desnutrición prenatal, evidenciada por un bajo peso de nacimiento, ha sido asociada a hipertensión, enfermedad coronaria y diabetes tipo 2 en la vida adulta. La hipertensión inducida por desnutrición prenatal, se piensa que entre otras causas, podría ser producida por un déficit del mecanismo de control por feedback negativo del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), lo cual sería programado durante la vida fetal. Dado que, la hormona hipotalámica liberadora de corticotropina (CRH) está implicada en el aumento de la presión arterial de humanos con hipertensión primaria y de ratas espontáneamente hipertensas, y que el RNAm de CRH hipotalámico se encuentra aumentado en ratas que sufrieron desnutrición prenatal, se estudió en ratas Wistar de 40 días de edad, tanto eutróficas como sometidas a desnutrición *in utero*: (i) presión arterial sistólica y diastólica mediante un sistema pletismográfico automático; (ii) concentración plasmática de CRH mediante RIA; (iii) acción de dexametasona en la concentración sérica de corticosterona mediante RIA. La desnutrición prenatal de las crías fue inducida por restricción dietaria de las madres (10 g diarios de dieta de laboratorio estándar con 20% de proteína). Las crías nacidas de madres con dieta estándar *ad libitum* se utilizaron como control. A los 40 días de edad, las ratas prenatalmente desnutridas, que tuvieron bajo peso de nacimiento, mostraron aumento de la presión arterial sistólica, aumento de la concentración plasmática de CRH, y aumento de la concentración sérica de corticosterona con una menor reactividad a la acción inhibitoria de dexametasona en los niveles de corticosterona. Estos resultados sugieren fuertemente que el eje HHA se encuentra hiperactivo en la vida postnatal de las ratas que sufrieron desnutrición prenatal debido, probablemente, a la ya reportada disminución en el número de receptores de glucocorticoides de estos animales en estructuras que regulan el eje HHA tales como hipocampo, hipotálamo e hipófisis, lo que podría implicar una disminución del control por feedback negativo que ejercen los glucocorticoides endógenos en la vida postnatal.

## SUMMARY

Epidemiological studies in humans have shown that impaired intrauterine growth is associated with an increased incidence of cardiovascular, metabolic, and other non transmissible diseases in later life. In mammals, prenatal undernutrition, evidenced by a low birth weight, has been linked to hypertension, ischemic heart disease, and type 2 diabetes when adults. Among other causes, hypertension induced by prenatal undernutrition is thought to be generated by a decreased glucocorticoid feedback control of the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis programmed during fetal life. It is known that mRNA of hypothalamic corticotropin-releasing hormone (CRH) of prenatally undernourished rats is increased. Since CRH is involved in the elevation of arterial blood pressure of spontaneously hypertensive rats and human with primary hypertension, it was studied at 40 days of age in eutrophics and *in utero* undernourished Wistar rats: (i) systolic and diastolic blood pressure measured by automatic plethysmographic system; (ii) plasma levels of CRH measured by RIA; (iii) dexamethasone action on serum levels of corticosterone measured by RIA. Prenatal undernutrition of pups was induced by submitting pregnant rats to food restriction (10 g daily of 20% protein standard laboratory diet). Pups born from pregnant dams with free access to the standard laboratory diet served as controls. At 40 days of age, undernourished rats, that had low birth weight, showed increased systolic blood pressure, increased plasma levels of CRH, increased serum levels of corticosterone, and reduced reactivity to dexamethasone action on corticosterone levels. These findings strongly suggest that HPA axis is hyperactive in postnatal life of rats that were submitted to prenatal undernutrition, probably due to the reported lower number of glucocorticoid receptors in these animals, regulating HPA axis in structures like hippocampus, hypothalamus and pituitary. This would implicate a diminished negative feedback control exerted by endogenous glucocorticoids in prenatally undernourished rats in adult life.

## I. INTRODUCCION

Desde el punto de vista médico es ampliamente aceptado que ciertos hábitos del estilo de vida de la población adulta son determinantes en el riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares. Así, el sedentarismo, la obesidad, el excesivo consumo de grasas saturadas y de sal, como también el tabaquismo, son factores que contribuyen al desarrollo de hipertensión arterial y enfermedad coronaria. No obstante lo anterior, evidencias recientes indican que el riesgo de hipertensión arterial, enfermedad coronaria y diabetes no dependiente de insulina, puede venir “programado” desde antes del nacimiento. En efecto, estudios epidemiológicos en humanos señalan que existe una asociación entre bajo peso de nacimiento y posterior desarrollo de hipertensión y diabetes no dependiente de insulina en la vida adulta. De estos estudios se infirió que enfermedades no transmisibles en la vida adulta son “programadas” en el período de vida intrauterino.

Un hecho fuera de toda discusión es que la cantidad y calidad de los nutrientes ingeridos por la madre son factores determinantes en el crecimiento fetal, de modo que una insuficiente alimentación de la madre durante la gestación llevará a desnutrición del feto, retardo de su crecimiento y bajo peso de nacimiento, pudiendo así conducir a presión arterial elevada en la vida adulta. Esta noción es apoyada por estudios en animales, los cuales documentan que ratas preñadas sometidas a diversas formas de restricción proteica y calórico-proteica paren crías de bajo peso, las que desarrollan presión arterial elevada durante la vida postnatal, a pesar de la rehabilitación nutricional durante la lactancia. Estos estados hipertensivos son dependientes, en gran medida, de cambios adaptativos en las respuestas endocrinas del feto, cambios que forman parte del proceso denominado programación fetal. La programación fetal sería el proceso a través del cual un estímulo o injuria aplicado durante un período crítico del desarrollo intrauterino da lugar a efectos de largo plazo, o permanentes, en los procesos metabólicos, endocrinos y fisiológicos, involucrando alteraciones estructurales y funcionales de distintos órganos y tejidos. Por ejemplo, la administración de glucocorticoides exógenos durante la gestación retarda el crecimiento del feto y conduce a una presión arterial elevada en la vida adulta de éste.

Dentro de la programación fetal, los glucocorticoides producidos por la corteza adrenal de la madre cumplen un rol fundamental, puesto que en condiciones nutricionales subóptimas éstos pueden aumentar, generando una acción inhibitoria en el normal

crecimiento del feto. En efecto, en condiciones normales los glucocorticoides maternos no pasan al compartimento fetal ya que son metabolizados por la enzima placentaria  $11\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 ( $11\beta$ -HSD2). Sin embargo, en condiciones de desnutrición esta enzima disminuye su actividad, por lo tanto, el feto queda sobreexposición a glucocorticoides de origen materno, lo cual programa una disminución de la expresión génica de receptores para corticoides en regiones cerebrales involucradas en el control de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales (HHA).

Uno de los principales activadores del eje HHA es la hormona hipotalámica liberadora de corticotropina (CRH), la que estimula la liberación de adrenocorticotropina (ACTH) desde la adenohipófisis. A su vez, ACTH estimula la liberación de corticosterona (cortisol en humanos y otros mamíferos), desde las glándulas adrenales. Por su parte, los glucocorticoides endógenos, como la corticosterona, y los exógenos, como la dexametasona, controlan la liberación de CRH a través de un sistema de retroalimentación negativa ejercido en el hipotálamo y en la adenohipófisis, con la consecuente disminución de ACTH y corticosterona circulante.

Interesantemente, la expresión génica de CRH se encuentra incrementada en el núcleo paraventricular hipotalámico (PVN) de humanos con hipertensión primaria y de ratas espontáneamente hipertensas. Además, un estudio reciente muestra que ratas expuestas a desnutrición prenatal tienen aumentada la expresión génica hipotalámica para RNAm de CRH en la vida postnatal, hecho que apuntaría a una hiperactivación del eje HHA en la vida adulta.

Hasta la fecha en que se inició este estudio la literatura no exhibía ningún registro en ratas que experimentaron desnutrición prenatal, respecto de la concentración plasmática de CRH en la circulación sistémica, como tampoco de la reactividad del eje HHA a glucocorticoides exógenos.

En consecuencia y dado el contexto anteriormente descrito, es de interés conocer si en ratas jóvenes la desnutrición prenatal altera: (i) la concentración plasmática de CRH y (ii) la normal acción inhibitoria de dexametasona en la concentración sérica de corticosterona. El dilucidar estos aspectos en un modelo animal de desnutrición prenatal, dado que no pueden estudiarse en humanos, puede contribuir tanto al descubrimiento de marcadores tempranos de hipertensión arterial, como al conocimiento de las relaciones causales entre desnutrición intrauterina y el posterior desarrollo de hipertensión arterial en la vida postnatal, temática de

alta relevancia clínica e impacto social en la actualidad, dado que los estados hipertensivos afectan a una importante proporción de la población mundial.

## II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1- Desnutrición prenatal, enfermedades de la vida adulta y programación fetal.

Estudios llevados a cabo en las últimas dos décadas sugieren fuertemente que el riesgo de hipertensión, enfermedad coronaria y diabetes no dependiente de insulina, viene ya determinado desde antes del nacimiento. Las primeras evidencias epidemiológicas, originadas de estudios en Inglaterra, mostraron una asociación entre bajo peso de nacimiento y posterior hipertensión en la vida adulta (Barker *et al.*, 1990), diabetes (Phillips *et al.*, 1994), así como muerte por accidentes cardiovasculares (Barker *et al.*, 1989; Osmond *et al.*, 1993). Estos antecedentes llevaron a David Barker a formular la hipótesis que plantea que la nutrición durante el período intrauterino y la exposición a infecciones luego del nacimiento condicionan la susceptibilidad a enfermar en la edad adulta (Barker, 1994).

Uno de los factores determinantes del crecimiento fetal es la nutrición de la madre. Así, períodos de desnutrición durante la preñez conducirán a desnutrición del feto y retardo del crecimiento de éste. Investigaciones en humanos establecieron que el feto desnutrido durante el primer trimestre de vida intrauterina al nacimiento es pequeño para su edad gestacional y, cuando son adultos, tienen una alta probabilidad de tener presión arterial elevada. Por su parte, el feto desnutrido durante el segundo trimestre de gestación, también tiene bajo peso de nacimiento y con tendencia a desarrollar hipertensión y diabetes (Phillips *et al.*, 1994).

Estas observaciones han llevado al concepto que señala que enfermedades de la vida adulta se originan *in utero* como resultado de alteraciones en el desarrollo normal del feto debido a condiciones intrauterinas subóptimas, las que frecuentemente se asocian a una evolución anormal del crecimiento fetal (Barker, 1994). El proceso por el cual injurias tempranas en etapas críticas del desarrollo llevan a cambios permanentes en la estructura y función de los tejidos, se conoce como programación intrauterina (Lucas, 1991). La programación fetal de la función fisiológica postnatal ha sido demostrada experimentalmente en varias especies animales usando un rango de técnicas que comprometen el ambiente intrauterino y que, por lo tanto, alteran el desarrollo fetal (McMillen y Robinson, 2005).

### 2- Inducción del retardo en el crecimiento intrauterino y consecuencias postnatales.

La noción que el retardo del crecimiento fetal está asociado con desarrollo de hipertensión en la vida postnatal, además de ser avalada por estudios epidemiológicos, ha

recibido un fuerte apoyo de investigaciones en animales de experimentación. Así, la inducción del retardo en el crecimiento intrauterino por estrés maternal, hipoxia, administración de glucocorticoides, manipulación dietaria, o insuficiencia placentaria, llevan a anormalidades postnatales en la función cardiovascular, metabólica y endocrina en ratas, cerdos, cobayos, ovejas, caballos y primates (Fowden *et al.*, 2005; McMillen y Robinson, 2005). En efecto, una de las primeras publicaciones a este respecto demostró que la ligadura de una arteria uterina en cobayas preñadas genera un severo retardo del crecimiento fetal, asociado a presión arterial elevada en la vida postnatal (Persson y Jansson, 1992). Más recientemente, se ha puesto en evidencia que ratas preñadas sometidas a diversas formas de restricción proteica paren crías de bajo peso que desarrollan hipertensión arterial posterior al destete (Langley-Evans y Jackson, 1994). Por su parte, la restricción calórico-proteica materna puede llevar también a severa restricción en el crecimiento del feto. Así, la restricción de la ingesta de alimento al 30% del consumo *ad libitum* en ratas preñadas, produce después del destete aumento de la presión arterial junto con un incremento de la concentración plasmática de insulina (Woodall *et al.*, 1996). Restricciones alimentarias menos severas en ratas gestantes, del orden del 40% de la ingesta *ad libitum*, genera también hipertensión en las crías a partir del día 40 de vida postnatal (Pérez *et al.*, 2002). Por otro lado, en la rata, la restricción materna de hierro dietario durante la preñez conduce a anemia y a déficit en el crecimiento del feto, con disminución de la presión arterial al destete respecto de los controles, pero con hipertensión a partir del día 40 de vida postnatal (Crowe *et al.*, 1995). Junto a esto, la administración prenatal de glucocorticoides exógenos retarda el crecimiento fetal en humanos (Seckl, 1994) y animales de experimentación (Novy y Walsh, 1983; Tonolo *et al.*, 1988; Berry *et al.*, 1997). Por ejemplo, en la rata la administración de dexametasona durante toda la preñez (Benediktsson *et al.*, 1993) o durante la tercera semana de preñez (Levitt *et al.*, 1996) eleva la presión arterial en la progenie adulta. Los estudios en animales también han demostrado que el momento, duración, y naturaleza exacta de la injuria durante la preñez son importantes determinantes no sólo del patrón de crecimiento intrauterino, sino también de las consecuencias fisiológicas específicas (Bertram y Hanson, 2001). Así en la rata, la administración de dexametasona durante la última semana de gestación, junto con inducir hipertensión arterial produce también en la edad adulta hiperglicemia e hiperinsulinemia persistentes (Nyirenda *et al.*, 1998). No obstante, en esta especie animal la ligadura de una arteria uterina durante el último tercio de gestación, no induce hipertensión arterial, a pesar que las crías nacen con severos déficits de peso corporal y con un

número reducido de nefronas (Merlet-Benichou *et al.*, 1994; Jansson y Lambert, 1999). De lo anteriormente descrito se desprende que no todas las restricciones del crecimiento fetal conducen a hipertensión en la vida adulta, pero aquellas que incluyen restricción proteica, restricción calórico-proteica, o tratamientos con glucocorticoides sí lo hacen.

Por su parte, la exposición de fetos de oveja a dexametasona por 2 días, comenzando el día 27 de gestación, fue suficiente para gatillar hipertensión que persistió hasta la vida adulta (5 años de edad). Sin embargo, estos animales no desarrollaron resistencia a la insulina, lo cual sugiere que la programación de la presión arterial y de la sensibilidad a la insulina en el feto ocurren en diferentes períodos de la vida intrauterina (Gatford *et al.*, 2000).

### **3-. Glucocorticoides, barrera placentaria y desnutrición prenatal.**

La administración prenatal de glucocorticoides exógenos altera la tasa de maduración de varios órganos, tales como pulmón, corazón, riñón e intestino (Seckl, 1998), actuando sobre los receptores para glucocorticoides, que como se sabe en roedores están altamente expresados en la mayoría de los tejidos fetales a partir de la mitad de la gestación o aún más temprano (Cole *et al.*, 1995; Díaz *et al.*, 1998). Sin embargo, aunque los glucocorticoides endógenos son ampliamente lipofílicos cruzando de este modo rápidamente la placenta, normalmente el feto tiene niveles fisiológicos de glucocorticoides mucho más bajos que los de su madre (Beitens *et al.*, 1973; Campbell y Murphy, 1977). Esto ocurre por acción de la enzima placentaria 11 $\beta$ -HSD2, la cual metaboliza el cortisol y corticosterona a sus formas inertes, que son cortisona y 11-dehidrocorticosterona, respectivamente (Murphy *et al.*, 1974; López-Bernal *et al.*, 1980). Esta barrera enzimático-placentaria asegura que la mayoría del cortisol materno, si no todo, sea inactivado (Benediktsson *et al.*, 1997), de modo que la mayor parte del cortisol presente en la circulación fetal humana provenga de las adrenales del feto (Seckl *et al.*, 2000). La actividad de 11 $\beta$ -HSD2 puede variar considerablemente a lo largo de la gestación, tanto en humanos como en ratas, permitiendo en algunas circunstancias un acceso aumentado de glucocorticoides maternos hacia el feto, lo cual puede retardar su crecimiento y programar respuestas que conduzcan posteriormente a enfermedades como hipertensión arterial y diabetes tipo 2 (Edwards *et al.*, 1993). En efecto, en ratas, menor actividad de 11 $\beta$ -HSD2 placentaria y presumiblemente mayor exposición fetal a glucocorticoides maternos se ha visto en fetos pequeños. Una asociación similar entre peso de nacimiento y actividad de 11 $\beta$ -HSD2 placentaria se ha discutido en humanos (Stewart *et al.*, 1995a). Además, mutaciones deletéreas

del gen que codifica para 11 $\beta$ -HSD2 en humanos se asocian con muy bajo peso de nacimiento (Dave-Sharma *et al.*, 1998). Por otro lado, el tratamiento de ratas preñadas con una dosis moderada de dexametasona (glucocorticoide sintético que cruza la placenta) reduce el peso de nacimiento de las crías y produce presión arterial elevada en la descendencia adulta muchos meses después de la exposición a este glucocorticoide *in útero* (Benediktsson *et al.*, 1993). Más aún, marcadores bioquímicos de exposición fetal a glucocorticoides, como osteocalcina, se correlacionan con la función de 11 $\beta$ -HSD2 placentaria al término de la gestación (Benediktsson *et al.*, 1995). Junto a esto, se ha demostrado que en ratas preñadas la administración de carbenexolona, un inhibidor de 11 $\beta$ -HSD2, produce efectos similares a los provocados por dexametasona, induciendo una reducción del peso de nacimiento en las crías con hipertensión e hiperglicemia en la edad adulta (Lindsay *et al.*, 1996a; Lindsay *et al.*, 1996b). Cabe destacar que en la rata la restricción proteica materna (9% de caseína en la dieta versus 18% en la dieta control) genera crecimiento anormal de la placenta y retardo del crecimiento fetal (Langley-Evans *et al.*, 1996a), junto con una disminución del orden del 33% en la actividad de la enzima placentaria 11 $\beta$ -HSD2 (Langley-Evans *et al.*, 1996c). Estudios más recientes indican que la desnutrición calórico-proteica materna (reducción al 50% de la dieta *ad libitum*) genera en la rata una disminución superior al 50% de los RNAm para 11 $\beta$ -HSD2 en la placenta (Lesage *et al.*, 2001). La reducción en la capacidad de la placenta para proteger al feto de los corticoides maternos parece jugar un rol clave en la patogénesis de la hipertensión inducida por la restricción de la ingesta proteica materna. En efecto, la adrenalectomía materna o el bloqueo de la síntesis de glucocorticoides maternos mediante metirapona evita el desarrollo de este tipo de hipertensión en la vida postnatal de la progenie prenatalmente desnutrida (Langley-Evans, 1997a); Langley-Evans, 1997b). Sin embargo, por mecanismos aún no dilucidados, la restricción proteica en la dieta de ratas preñadas atenúa selectivamente la actividad de 11 $\beta$ -HSD2, pero no de otras enzimas placentarias (Langley-Evans *et al.*, 1996c). Aunque la actividad de 11 $\beta$ -HSD2 en la placenta está disminuida por el déficit nutricional y el grueso de las ideas apunta a la malnutrición materna como el factor más importante en la sobreexposición fetal a glucocorticoides, existen aún algunos aspectos no aclarados al respecto. Así, por una parte se ha argumentado que 11 $\beta$ -HSD2 no constituye la clave para la programación *in utero* de la hipertensión, ya que en humanos (Stewart *et al.*, 1995b) no se ha observado correlación entre la actividad de esta enzima y peso de la placenta (un predictor de futura hipertensión). No obstante, experimentos en los que se utilizó placenta fresca en un sistema de perfusión *ex vivo*

señalan que tal relación si existe en el hombre (Seckl, 1998), al igual que en la rata (Benediktsson *et al.*, 1993).

#### **4-. Eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), CRH y Corticosterona.**

En el hombre el cortisol es el principal glucocorticoide, mientras que en la rata, que no produce cortisol, el principal glucocorticoide es la corticosterona (Whorwood y Steward, 1996; White *et al.*, 1997). Su estimulador inmediato es la adenocorticotropina (ACTH), péptido de 39 aminoácidos liberado desde la adenohipófisis. A su vez, el estimulador más importante de la secreción de ACTH es la hormona hipotalámica liberadora de corticotropina (CRH), péptido de 41 aminoácidos y de peso molecular 4,7 kDa (Eckart *et al.*, 1999) sintetizado por células neuroendocrinas parvocelulares y magnocelulares del núcleo paraventricular hipotalámico (PVN). Por lo tanto, existe un eje hipotálamo, adenohipófisis y corteza adrenal (HHA) que como se sabe constituye un clásico circuito de retroalimentación negativa. En efecto, la corticosterona (cortisol en humanos) o cualquier análogo glucocorticoide sintético, como la dexametasona o la prednisona: (1) inhibe en minutos la liberación de ACTH por retroalimentación (asa larga), al bloquear la acción estimuladora de CRH sobre las células corticotrofas hipofisarias; (2) inhibe más lentamente, en horas, la síntesis de ACTH por retroalimentación al bloquear la transcripción de su gen; (3) bloquea la liberación de CRH por retroalimentación sobre el hipotálamo. En la retroalimentación de asa corta, la ACTH inhibe la liberación de CRH (Genuth, 2001).

Los esteroides adrenales, como la corticosterona, derivan principalmente del colesterol circulante captado por los receptores LDL y en menor proporción del colesterol sintetizado en las propias células a partir del acetato o del HDL-colesterol captado por otros receptores (Jara y González, 2001). La síntesis de corticosterona se lleva a cabo fundamentalmente en la zona fasciculada de la corteza adrenal. La reacción inicial y limitante de su velocidad, convierte el colesterol en pregnenolona por la acción de la enzima 20,22-desmolasa (P-450scc). A continuación, la pregnenolona es convertida en progesterona mediante la enzima 3 $\beta$ -ol-deshidrogenasa,  $\Delta^{4,5}$ -isomerasa. A su vez, la progesterona se transforma en 11-desoxicorticosterona por la acción de la enzima 21-hidroxilasa (P-450c17). Finalmente, la 11-desoxicorticosterona es convertida a corticosterona, reacción catalizada por la enzima 11-hidroxilasa (P-450c21) (Genuth, 2001).

En ratas Wistar de 4 semanas de edad la concentración plasmática de corticosterona aumenta con el comienzo del ciclo de oscuridad, con un pick a las 21:00 hr., y disminuye con el comienzo del ciclo lumínico. Es así como, la corticosterona plasmática es significativamente más baja entre las 9:00 y 15:00 hrs. respecto de las 21:00 hr. Interesantemente, el perfil de esta variación diaria en los niveles de corticosterona no se altera con restricción proteica prenatal (Langley-Evans *et al.*, 1996b).

### **5-. Glucocorticoides y programación fetal del eje HHA.**

Dado que por una parte, los receptores para corticosterona ya están presentes en el cerebro de fetos de ratas en el día 15 de gestación (Cintra *et al.*, 1993), y por otra parte, el eje HHA ya es funcional en la tercera semana de gestación en esta especie animal (Dupouy *et al.*, 1987), el exceso de glucocorticoides en el feto puede ser considerado como una influencia supresora en el desarrollo de la función adrenal fetal, en la medida que una excesiva inhibición de la secreción de ACTH fetal por los glucocorticoides maternos puede determinar una reducción del crecimiento adrenal, así como una disminución de su producción de esteroides (Lesage *et al.*, 2001; Stewart *et al.*, 1995b). Estos datos sugieren que la hipoactividad del eje HHA fetal, es el resultado del aumento del control por retroalimentación negativa ejercido por los elevados niveles fetales de corticosterona circulante, que provienen del compartimento materno. La baja actividad del eje HHA en ratas recién nacidas que fueron expuestas a restricción dietaria prenatal es también sugerida por la significativa reducción de los niveles circulantes de ACTH al nacimiento, en comparación con los controles (Lesage *et al.*, 2001). Por otra parte, debe tenerse en consideración que los receptores para glucocorticoides existentes en regiones cerebrales que regulan la actividad del eje HHA, experimentan cambios adaptativos frente a la sobreexposición de estos esteroides durante la vida fetal. En efecto, en ratas la expresión génica para los receptores de glucocorticoides y mineralocorticoides se reduce significativamente tanto en hipocampo (Lesage *et al.*, 2001) como en hipotálamo (Bertram *et al.*, 2001) en crías nacidas de madres sometidas a restricción dietaria durante la gestación. De igual modo, la expresión de RNAm para receptores de glucocorticoides está reducida en la adenohipófisis de fetos de oveja sometidos a desnutrición materna (Hawkins *et al.*, 2001). En este mismo sentido, en la rata la exposición prenatal a dexametasona también atenúa permanentemente la expresión génica de los receptores para glucocorticoides y mineralocorticoides en regiones hipocampales involucradas en el control de retroalimentación

negativa de la actividad del eje HHA, lo que da lugar a una elevación de las concentraciones plasmáticas de corticosterona en la vida adulta por reducción de la retroalimentación negativa (Levitt *et al.*, 1996). La disminución del número de receptores para glucocorticoides, como una respuesta adaptativa frente a la sobreexposición de corticoides maternos, tiene consecuencias importantes para el desarrollo postnatal. En efecto, se ha observado que fetos de oveja sometidos a desnutrición materna presentan un eje HHA hipoactivo, pero durante el desarrollo postnatal incrementan la actividad del eje por sobre los controles eutróficos, mostrando aumentos en la ACTH y cortisol basales, junto al desarrollo de hipertensión arterial (Hawkins *et al.*, 2000a). Un estudio reciente, en que se utilizó un modelo de desnutrición prenatal en rata, mediante restricción calórico-proteica materna, señala que la expresión génica hipotalámica para RNAm de CRH está aumentada respecto de los animales eutróficos a los 2 y 40 días de vida postnatal (Pérez *et al.*, 2004). Interesantemente, los RNAm para CRH también están aumentados en el núcleo paraventricular hipotalámico, tanto de ratas espontáneamente hipertensas (Krukoff *et al.*, 1999), como en humanos con hipertensión primaria (Goncharuk *et al.*, 2002).

#### **6-. CRH, sistemas noradrenérgicos centrales e hipertensión arterial.**

La patogénesis de la hipertensión primaria en humanos y de la hipertensión espontánea en la rata, está asociada con hiperactividad del eje HHA y de la rama simpática del sistema nervioso autónomo (Hashimoto *et al.*, 1989; Grassi, 1998; Al'Absi y Arnett, 2000; Bjorntorp *et al.*, 2000). Ambos sistemas, el eje HHA y la rama simpática, son regulados, entre otros núcleos centrales, por el PVN donde las células neuroendocrinas parvocelulares y magnocelulares que producen CRH desempeñan un rol crucial. En efecto, estudios en animales de experimentación han mostrado que las neuronas parvocelulares del PVN proyectan a la eminencia media y secretan CRH a la circulación portal, para que la adenohipófisis libere ACTH. Las neuronas magnocelulares del PVN proyectan a la hipófisis posterior, donde CRH es liberado a la circulación general. Una tercera población de neuronas del PVN utiliza CRH como neurotransmisor e inerva centros catecolaminérgicos del tronco encefálico, a través de los cuales ejerce su influencia en neuronas simpáticas espinales involucradas en funciones cardiovasculares (Swanson *et al.*, 1987; Aston-Jones *et al.*, 1991; Chalmers y Pilowsky 1991; Valentino *et al.*, 1992). A su vez, la inyección intracerebroventricular de CRH induce aumento de la expresión del gen que codifica para CRH (Parkes *et al.*, 1993), y al mismo tiempo produce

aumentos de presión arterial y de la frecuencia cardíaca, como igualmente respuestas endocrinas que evocan la activación del eje HHA (Kalin *et al.*, 1983; Saunders y Thornwill, 1986; Brown y Fisher, 1988). Más aún, la administración intracerebroventricular de CRH aumenta la actividad eléctrica de neuronas de áreas cerebrales involucradas en la regulación cardiovascular que reciben inervación CRHérgica del PVN (Swanson *et al.*, 1987; Valentino y Footes, 1988). Por último, la microinyección de CRH en esas áreas produce una respuesta vasopresora (Ku *et al.*, 1988). Las ratas espontáneamente hipertensas (SHR) muestran expresión elevada del RNAm para CRH, comparadas con las ratas normotensas (WKY) (Krukoff *et al.*, 1999). En humanos con hipertensión primaria, se ha logrado poner en evidencia manifestaciones morfológicas de la actividad de células neurosecretoras del PVN, mediante análisis morfométricos postmortem, consistentes en aumento del número de neuronas CRH positivas e incremento en la cantidad del RNAm para CRH (Goncharuk *et al.*, 2002). El rol de las proyecciones recíprocas entre el PVN y centros del tronco encefálico implicados en la regulación cardiovascular, ha recibido considerable atención últimamente. Así, junto con las mencionadas proyecciones CRHérgicas que van desde el PVN a núcleos catecolaminérgicos del tronco encefálico, tales como núcleos A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> y A<sub>6</sub> (*locus coeruleus*), existen conexiones recíprocas desde estos núcleos al PVN (Sawchenko y Swanson., 1995; Cunningham y Sawchenko, 1988; Saphier, 1989). Estas conexiones recíprocas mutuas son excitatorias, es decir, las conexiones CRHérgicas excitan neuronas noradrenérgicas del tronco cerebral (Page y Abercrombie, 1999; Schulz y Lehner, 1996; Rassnick *et al.*, 1998; Curtis *et al.*, 1997), y las conexiones noradrenérgicas provenientes de los núcleos catecolaminérgicos mencionados excitan a su vez a las neuronas del PVN (Saphier, 1989; Day *et al.*, 1984; Kim y Dudley, 1989; Saphier, 1993). Junto a esto, en ratas SHR ha sido demostrada una correlación positiva entre liberación de noradrenalina a nivel del PVN con presión arterial, siendo esta liberación especialmente prominente durante el desarrollo de la hipertensión en los animales jóvenes (Qualy y Westfall, 1993). El loop excitatorio entre el PVN y el complejo noradrenérgico A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, y locus coeruleus (LC) puede tener una gran relevancia en la hipertensión arterial, por cuanto los núcleos noradrenérgicos señalados pueden participar directamente en el desarrollo y mantención de los estados hipertensivos, estimulando las neuronas de origen del sistema nervioso simpático (Lambert, 2001). En un estudio reciente los resultados electrofisiológicos y cardiovasculares muestran la existencia de un loop de retroalimentación positiva entre el PVN y el LC, en que CRH microinyectado en el PVN

produce incremento tanto de la actividad bioeléctrica en ambos núcleos, como incrementos en la presión arterial de los animales eutróficos, respuestas que no es posible reproducir en animales que experimentaron desnutrición prenatal. Este diferente comportamiento apunta a la noción de que en animales desnutridos el loop excitatorio recíproco PVN-LC ya se encuentra hiperactivo, por lo que el sistema es incapaz de exacerbar aún más su respuesta. Este hecho queda además reflejado por que la actividad bioeléctrica basal de ambos núcleos y la presión arterial basal de los animales desnutridos es significativamente mayor que en los normales (Pérez *et al.*, 2006). Además, debe tenerse en consideración que los grupos noradrenérgicos del tronco cerebral inhiben la actividad neuronal en el núcleo del tracto solitario (NTS), primer sitio de relevo sináptico de la información barosensorial, uno de cuyos roles fisiológicos principales es mediar reflejos barosensoriales que se oponen a alzas de presión arterial, lo que ha sido demostrado electrofisiológicamente (Chan *et al.*, 1992). Evidencia adicional señala que tanto la estimulación eléctrica del LC (Kawamura *et al.*, 1978; Chida *et al.*, 1983; Gurtu *et al.*, 1984), como la administración de agonistas de adrenorreceptores  $\alpha_1$  intra NTS (Kubo *et al.*, 1987), generan aumentos de presión arterial en la rata. En otras palabras, el aumento de la actividad neuronal en el complejo A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, y LC estimula la rama autonómica simpática y deprime al mismo tiempo el reflejo barosensorial a través de influencias noradrenérgicas inhibitorias sobre la descarga neuronal del NTS, influencias que conducirán inevitablemente a la generación de hipertensión arterial. Interesantemente, la desnutrición proteica en ratas preñadas induce en las crías hiperactividad noradrenérgica central, la que se manifiesta por aumento en los niveles de tirosina hidroxilasa en el cerebro de estos animales (Shoemaker y Wurtman, 1971). Este estado de hiperactividad noradrenérgica, como queda de manifiesto por la liberación aumentada en los animales desnutridos prenatalmente, puede detectarse al nacimiento de las crías y se mantiene durante la lactancia (Soto-Moyano *et al.*, 1995), período en cual se desarrolla el fenómeno hipertensivo.

### **III. HIPÓTESIS**

1-. La concentración plasmática de CRH se encontrará elevada en ratas de 40 días de edad que fueron sometidas a desnutrición prenatal, respecto de los controles eutróficos.

2-. Frente a la inyección de dexametasona, la concentración sérica de corticosterona presentará una menor disminución en ratas de 40 días de edad que fueron sometidas a desnutrición prenatal, respecto de los controles eutróficos.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **1-. Objetivo general**

Estudiar en la rata los efectos que genera la desnutrición calórico-proteica prenatal en la actividad del eje HHA en la vida postnatal, a través de la medición de la concentración plasmática de CRH y a través de la cuantificación de la concentración sérica de corticosterona, luego de la administración de un glucocorticoide exógeno.

#### **2-. Objetivos Específicos**

2.1-. Medir en ratas de 40 días de edad, tanto eutróficas como sometidas a desnutrición prenatal, la presión arterial sistólica y diastólica.

2.2-. Cuantificar en ratas de 40 días de edad, tanto eutróficas como sometidas a desnutrición prenatal, la concentración plasmática de CRH mediante radioinmunoensayo (RIA).

2.3-. Cuantificar en ratas de 40 días de edad, tanto eutróficas como sometidas a desnutrición prenatal, la influencia de dexametasona sobre la concentración sérica de corticosterona mediante radioinmunoensayo (RIA).

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1- Animales.

Todos los animales usados en esta memoria de título permanecieron en el Bioterio del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos (INTA) de la Universidad de Chile, bajo un régimen de 12 horas luz/12 horas oscuridad, a una temperatura de 24°C. Es importante destacar que las manipulaciones experimentales se rigieron por las normas aprobadas en el comité de bioética del INTA. La especificación respecto del horario de algunos procedimientos es sólo para dejar claro que siempre se realizaron a la misma hora del día de modo que las mediciones no fueran influenciadas por las distintas fases del ciclo circadiano.

Como modelo experimental se usaron ratas de la cepa Wistar de 40 días de edad, tanto machos como hembras, pertenecientes a 4 grupos distintos según tratamiento nutricional y farmacológico: (1) ratas eutróficas; (2) ratas sometidas a restricción calórico-proteica prenatal; (3) ratas eutróficas dosificadas con dexametasona; (4) ratas sometidas a restricción calórico-proteica prenatal dosificadas con dexametasona. Todos los grupos estuvieron con alimento y agua *ad libitum* en una jaula de crianza (Figura N° 1) claramente rotulada con el número de camada, la fecha de nacimiento y el grupo experimental al cual pertenecían.

Para la obtención de los ejemplares usados en este experimento se utilizaron ratas nulíparas que fluctuaban entre 65 y 80 días de edad. A partir de las 19:00 hr. estas ratas fueron colocadas en jaulas de apareamiento (Figura N° 2) a razón de 2 hembras por macho con un número total de 9 animales en cada jaula. A las 9:00 hr. del día siguiente se retiraron todos los animales, luego de lo cual a las hembras se les practicó un diagnóstico presuntivo de gestación, consistente en un rápido y repetitivo proceso de influjo y succión de 2 ml de suero NaCl 0.9% a 37°C en el canal vaginal mediante pipeta Pasteur (Figura N° 3). El contenido de la última succión fue extendido sobre un portaobjetos y observado al microscopio para constatar la presencia de espermios (Figura N° 4). Las ratas positivas a espermios se diagnosticaron como “presuntamente preñadas”, siendo asignadas al azar a uno de dos grupos según tratamiento dietario: (A) ratas gestantes alimentadas *ad libitum*, (B) ratas gestantes con restricción alimentaria. Finalmente fueron colocadas cada una en una jaula de crianza, claramente rotulada con el grupo experimental al que pertenecían y la fecha del diagnóstico presuntivo de preñez que se contabilizó como el día cero de gestación.



**Figura N° 1:** Jaula de policarbonato de crianza de 45 x 24 x 14 cm con tapa metálica, dispensador de agua y dieta Champion.



**Figura N° 2:** Jaula de policarbonato de apareamiento de 50 x 40 x 20 cm con tapa metálica, dispensador de agua y dieta Champion.



**Figura N° 3:** Influjó y succión de suero NaCl 0.9% a 37°C en canal vaginal de la rata mediante pipeta Pasteur.



**Figura N° 4:** Observación en microscopio Leitz Weslar de extendido de suero NaCl 0.9% succionado del canal vaginal de rata.

## **2.- Tratamiento dietario de progenitoras (modelo de desnutrición prenatal).**

Una vez que cada una de las ratas estaban en sus jaulas de crianza, a las del grupo **B** se les racionó el alimento de manera tal que sólo recibieron el 40% del consumo *ad libitum*, considerando que la ingesta diaria promedio de una rata Wistar gestante es de aproximadamente 25 g. Para este propósito se les suministró sólo 10 g al día de dieta Champion Rata Laboratorio extruido (proteína cruda 20,5%, energía metabolizable 3 Kcal/gr, fibra cruda 5%, extracto etéreo 4%, humedad 14%). Este alimento fue previamente molido y pesado en una balanza electrónica (Figura N° 5), y dispuesto todas las mañanas en un recipiente especialmente diseñado para este propósito (Figura N° 6). Por otro lado, las

hembras pertenecientes al grupo **A** fueron alimentadas *ad libitum* con la misma dieta. Ambos grupos de hembras siempre dispusieron de agua fresca *ad libitum*.

Durante la gestación, las ratas de ambos grupos fueron pesadas individualmente todas las mañanas en una balanza mecánica (Figura N° 7), información con la cual se construyó una curva de peso para cada grupo de ratas. Las hembras que al día 23 no parieron fueron eliminadas del experimento y puestas a disposición del Bioterio.

El día del nacimiento se contabilizó como el día 0 de vida postnatal. Una vez que las hembras parieron, todas las crías, vivas y muertas, fueron contadas pesadas y sexadas, luego de lo cual las camadas se estandarizaron a 8 crías, 4 machos y 4 hembras. Las crías descendientes de madres del grupo **A** constituyeron los animales pertenecientes al grupo **1** (ratas eutróficas) del modelo experimental, quedando cada una de estas camadas en una jaula de crianza debidamente rotulada. En el caso de las crías nacidas de madres del grupo **B** constituyeron los animales del grupo **2** (ratas cuyas madres fueron sometidas a restricción calórico-proteica) del modelo experimental, quedando cada una de estas camadas en una jaula de crianza, debidamente rotulada, con una nodriza eutrófica que parió dentro del mismo día, para lo cual la madre original y las crías de la nodriza fueron puestas a disposición del Bioterio.

Diariamente y hasta los 40 días de vida postnatal, tanto las crías pertenecientes al grupo **1**, como las pertenecientes al grupo **2**, fueron pesadas individualmente todas las mañanas en la balanza electrónica (Figura N° 8) para construir curvas de peso con el objeto de verificar la ganancia de peso de cada grupo. Luego del pesaje, a todas las camadas se les suministró agua y alimento *ad libitum*. Ambos grupos fueron destetados a los 23 días de edad, para lo cual las madres fueron retiradas de la jaula de crianza y puestas a disposición del Bioterio.



**Figura N° 5:** Pesaje de 10 g de dieta Champion Rata Laboratorio extruido, previamente molida, en balanza electrónica Portable Plus Ohaus.



**Figura N° 6:** Posillo de vidrio de 8 cm de diámetro y 3 cm de alto con cilindro interno de 4 cm de diámetro y 4 cm de alto.



**Figura N° 7:** hembra Wistar con dos semanas de gestación pesada en balanza Fisher Scientific CO.



**Figura N° 8:** cría Wistar de 3 días de vida pesada en balanza electrónica Portable Plus Ohaus.

### 3-. Tratamiento con dexametasona.

A los 39 días de edad, a partir de las 19:00 hr., desde los grupos experimentales 1 y 2 se retiraron aleatoriamente dos ratas por camada, a las cuales se les administró una dosis de dexametasona de 100  $\mu\text{g}/\text{kg}$  vía inyección subcutánea con microjeringa (Figuras N° 9 y N° 10), generándose de esta manera el grupo 3, correspondiente a ratas eutróficas dosificadas con dexametasona, y el grupo 4, correspondiente a ratas sometidas a desnutrición prenatal dosificadas con dexametasona. Cada uno de estos grupos quedó en jaulas de crianza separadas y debidamente rotuladas.



**Figura N° 9:** Microjeringa Microliter # 802 con ampollas de 4 mg/ml de dexametasona de Laboratorio Sanderson.



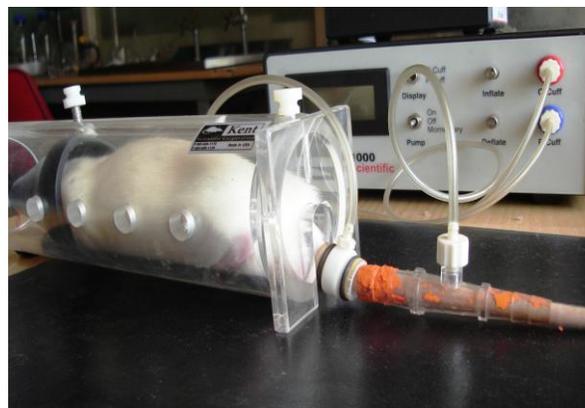
**Figura N° 10:** inyección subcutánea de dexametasona a rata de 39 días de edad.

#### **4. Medición de presión arterial sistólica y diastólica.**

A los 40 días de edad, a partir de las 10:00 AM, igual número de ratas de los grupos **1** y **2** fueron seleccionadas aleatoriamente y llevadas en jaulas de crianza al Laboratorio de Hormonas y Receptores del INTA, en donde se les midió la presión arterial sistólica y diastólica mediante un pletismógrafo Rat Tail Blood Pressure XBP 1000 (Torrington, USA) (Figura N° 11), sistema no invasivo que se aplica en la cola de la rata y se basa en el principio del pletismógrafo del antebrazo que registra el retorno del flujo de sangre después de su oclusión. Básicamente se emplea un brazalete de oclusión en la base de la cola y un brazalete pletismográfico inmediatamente caudal al primero. El brazalete de oclusión se infla hasta detener la circulación de la cola y el brazalete pletismográfico monitorea la ingurgitación de la cola dada por la restitución del flujo sanguíneo. Esto último produce una señal muy característica mediante la cual puede medirse la presión arterial sistólica y diastólica. La presión sistólica es medida cuando la cola comienza a ingurgitarse y la presión diastólica cuando este proceso termina. Es decir, cuando la señal pletismográfica alcanza un mínimo la presión de oclusión corresponde a la presión sistólica, y cuando la señal pletismográfica alcanza un máximo la presión de oclusión corresponde a la presión diastólica. El sistema XBP 1000 es completamente automático. Presionando un botón se infla el brazalete de oclusión, regula su deflación y las señales de presión son registradas y almacenadas en el software XBP 001 Automated System (Torrington, USA). Al momento de medir la presión a cada rata se le practicó el siguiente procedimiento: (i) introducción en cilindro acrílico de inmovilización. Este cilindro en uno de sus extremos tiene una pieza cónica que contiene la cabeza del animal y en el otro una entrada que se bloquea con una tapa circular que tiene un sacabocado de 1cm de diámetro permitiendo que la cola quede expuesta. Para lograr que la rata permaneciera tranquila dentro del tubo fueron necesarias dos sesiones de entrenamiento que se realizaron durante los dos días previos a la medición, cuyo propósito fue minimizar el efecto del estrés por inmovilización en los registros. (ii) colocación del brazalete de oclusión justo en la base de la cola y del brazalete pletismográfico inmediatamente caudal al primero (Figura N° 12). (iii) accionamiento del sistema con el consecuente inflado del brazalete de oclusión, deflación de éste y registro automático de la presión arterial sistólica y diastólica. (iv) retiro de la rata del sistema para ser dejada en su jaula. Luego estos animales fueron puestos a disposición del bioterio.



**Figura N° 11:** Sistema pletorespirométrico Rat Tail Blood Pressure XBP 1000 Kent Scientific.



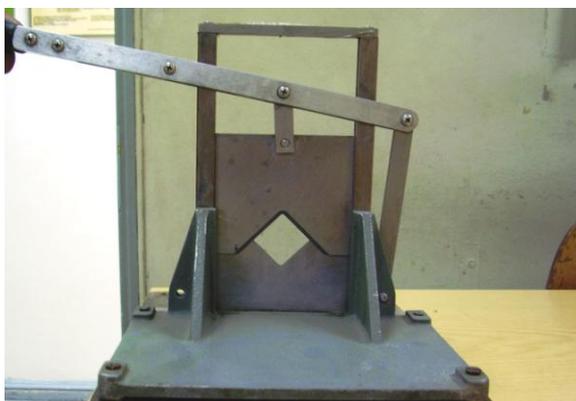
**Figuras N° 12:** Rata de 40 días en cilindro de inmovilización con brazaletes de oclusión y pletorespirométrico instalados en la cola.

## 5-. Cuantificación de la concentración plasmática de CRH mediante RIA.

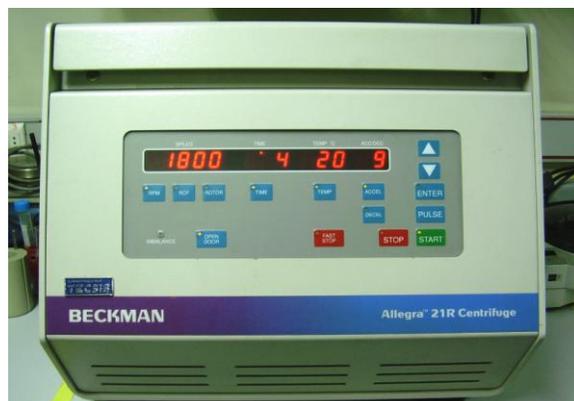
### 5.1-. Toma de muestras.

Aproximadamente a las 11:00 AM, ratas de los grupos **1** y **2** fueron llevadas en sus jaulas a una sala con ausencia de ruido y distante del lugar de sacrificio, momento a partir del cual a cada una de ellas y por separado se les realizó el siguiente procedimiento: (i) retiro cuidadoso de la jaula para ser conducidas a la sala de sacrificio. (ii) suave y rápida inmovilización del animal en guante de sujeción. (iii) posicionamiento del animal en guillotina (Figura N° 13) para con un golpe rápido decapitar al animal. (iv) recolección de aproximadamente 1 ml de sangrado en tubo Eppendorf, previamente heparinizado (30  $\mu$ l de heparina sódica, Laboratorio Sanderson 5000 UI/ml) y rotulado. (v) eliminación del cadáver según las normas de bioseguridad establecidas por el INTA y lavado prolijo de la guillotina antes de iniciar el procedimiento con el próximo animal.

Posteriormente las muestras de sangre contenidas en los tubos Eppendorf fueron centrifugadas a 1620 x g por 10 minutos a 4°C (Figura N° 14), luego de lo cual, con una micropipeta a cada muestra se le extrajo el sobrenadante obteniendo aproximadamente 500  $\mu$ l de plasma. Cada muestra de plasma se almacenó por separado en un nuevo tubo Eppendorf de 1ml al interior de un congelador Miele a -20°C hasta completar el número de muestras requerido por el experimento.



**Figura N° 13:** guillotina para la decapitación de ratas.



**Figura N° 14:** centrífuga Beckman Allegra 21 R.

### 5.2.- Tratamiento de las muestras de plasma.

Las muestras de plasma fueron descongeladas en baño termostático a 37°C, luego de lo cual, en tubos de poliestireno debidamente rotulados, 400  $\mu$ l de cada muestra fueron acidificados con igual volumen de ácido trifluoroacético (TFA) al 1% (buffer A) y agitados en vortex. A continuación los 800  $\mu$ l de cada tubo fueron centrifugados a 6000 x g por 20 minutos a 4°C (Figura N° 14) resultando un precipitado en forma de pellet adherido al fondo del tubo y un sobrenadante libre de elementos de alto peso molecular, tales como proteínas y polipéptidos. Luego cada sobrenadante fue purificado mediante una extracción en fase sólida (SPE), para lo cual se utilizaron columnas de fase reversa con matriz de sílica C18 de 500 mg (Merck Lichrolut RP-18), previamente equilibradas con 1 ml de acetonitrilo 60% en TFA 1% (buffer B) seguido de 1 ml de buffer A, y conectadas a una cámara de extracción por vacío (Figura N° 15). Una vez cargadas las muestras en las columnas, estas fueron lavadas dos veces con 3 ml de buffer A, eliminando selectivamente los componentes no unidos a la matriz de la columna. Los péptidos unidos a la matriz de la columna fueron eluidos con 3 ml de buffer B, recolectados en un tubo de propileno debidamente rotulado y liofilizados a sequedad (Figura N° 16). Finalmente cada muestra liofilizada fue reconstituida con 250  $\mu$ l de buffer RIA (Phoenix Pharmaceuticals Co.) en un nuevo tubo de poliestireno.



**Figura N° 15:** columnas de sílica Merck Lichrolut RP-18 conectadas a cámara de extracción por vacío Supelco.



**Figura N° 16:** liofilizador Savant Refrigerated Condensation Trap R 100.

### 5.3-. Protocolo del kit RIA específico para CRH de rata.

Este ensayo se basa en la competencia que se establece entre CRH marcado con  $I^{125}$  (CRH- $I^{125}$ ) y CRH, tanto de un estándar como de una muestra, por la unión a una cantidad limitada de anticuerpo específico para CRH. De este modo, cuando la cantidad de CRH presente en una muestra (o en un estándar) aumenta, la cantidad de anticuerpo disponible para enlazarse al CRH- $I^{125}$  disminuye. En el kit RIA utilizado en este experimento (Phoenix Pharmaceuticals) CRH- $I^{125}$  compete con CRH de la muestra o del estándar por la unión a un anticuerpo anti CRH de rata hecho en conejo. El CRH- $I^{125}$  libre es descartado luego de la precipitación del anticuerpo anti CRH (anticuerpo primario) unido a CRH- $I^{125}$  mediante un segundo anticuerpo IgG anticonejo, hecho en cabra, que se une a diferentes sitios del anticuerpo primario generando un complejo de precipitación. Luego de descartar el sobrenadante, la cantidad de CRH- $I^{125}$  unido al anticuerpo primario es cuantificado en un contador de radiación gama en forma de cuentas por minuto (cpm). Mediante una curva estándar o de calibración confeccionada con estándares de CRH estas cpm son transformadas a una expresión de concentración de CRH (pg/100  $\mu$ l) presente en la muestra. Este kit Phoenix Pharmaceuticals tiene una especificidad de 100% para CRH de rata y una sensibilidad de 1 pg/100  $\mu$ l.

**a) Contenido del kit:** 50 ml de buffer RIA concentrado que fué diluido en 150 ml de agua destilada; 12,8 µg de CRH estándar (polvo liofilizado) que fué reconstituido con 1 ml de buffer RIA; antisuero de conejo específico para CRH de rata (polvo liofilizado) que fué reconstituido con 13 ml de buffer RIA; 1,5 µCi de CRH marcado con I<sup>125</sup> (polvo liofilizado); suero IgG anti-conejo de caprino (GAR) (polvo liofilizado), que fue reconstituido con 13 ml de buffer RIA; suero normal de conejo (NRS) (polvo liofilizado), que fue reconstituido con 13 ml de buffer RIA. Para la realización del ensayo se utilizaron sólo tubos de poliestireno de 12 x 75 mm.

**b) Preparación de la curva estándar o de calibración:** a partir de una solución de CRH estándar de 12,8 x 10<sup>2</sup> pg/ml se realizaron siete diluciones seriadas al 50% con buffer RIA, quedando ocho tubos con concentraciones decrecientes rotulados de la A a la H. Luego, de cada uno de estos tubos se extrajeron dos duplicados de 100 µl cada uno, obteniéndose así 8 pares de tubos, los cuales fueron ordenados desde el par con menor concentración de CRH estándar al con mayor concentración, siendo numerados correlativamente desde el número 7 al 22. (Tabla N° 1).

**Tabla N° 1.** Preparación de la curva estándar indicando los volúmenes de dilución y la concentración de CRH estándar en los tubos A, B, C, D, E, F, G, H. La concentración final de CRH en cada uno de los duplicados numerados del 7 al 22, a partir de los cuales se construyó la curva de calibración, se muestra en la columna de la derecha de la tabla.

Tubo	Volumen a diluir	Buffer RIA	Concentración de CRH estándar	N° tubo en RIA	Concentración de CRH estándar por duplicado.
A	10 µl stock	990 µl	12,8 x 10 <sup>2</sup> pg/ml	21, 22	128 pg/100 µl
B	500 µl A	500 µl	6,4 x 10 <sup>2</sup> pg/ml	19, 20	64 pg/100 µl
C	500 µl B	500 µl	3,2 x 10 <sup>2</sup> pg/ml	17, 18	32 pg/100 µl
D	500 µl C	500 µl	1,6 x 10 <sup>2</sup> pg/ml	15, 16	16 pg/100 µl
E	500 µl D	500 µl	0,8 x 10 <sup>2</sup> pg/ml	13, 14	8 pg/100 µl
F	500 µl E	500 µl	0,4 x 10 <sup>2</sup> pg/ml	11, 12	4 pg/100 µl
G	500 µl F	500 µl	0,2 x 10 <sup>2</sup> pg/ml	9, 10	2 pg/100 µl
H	500 µl G	500 µl	0,1 x 10 <sup>2</sup> pg/ml	7, 8	1 pg/100 µl

**c) Control de calidad del RIA:** se prepararon por duplicado los tubos para determinar Cuentas Totales (TC-1 y TC-2), Uniones No Específicas (NSB-1 y NSB-2) y Uniones Totales (TB-1 y TB-2). A continuación, a cada tubo NSB se le añadió 200 µl de buffer RIA y a los TB se le añadió sólo 100 µl de buffer RIA.

**d) Carga de las muestras:** en los tubos siguientes se agregaron por duplicado 100 µl de cada muestra (plasma tratado, liofilizado y reconstituido en buffer RIA), colocando primero el set correspondiente a las ratas del grupo **1** seguido por el set del grupo **2**, siendo estos tubos ordenados correlativamente del número 23 al 58 (9 muestras de cada grupo por duplicado).

**e) Incubación del anticuerpo primario:** se añadieron 100 µl del anticuerpo primario (suero anti CRH) a los tubos TB, estándares y muestras. Luego la totalidad de los tubos fueron agitados en vortex por 15 segundos, cubiertos con parafilm e incubados por 24 horas a 4°C. (Tabla N° 2)

**f) Incubación del trazador (CRH-I<sup>125</sup>):** Momentos antes de concluir la incubación del anticuerpo primario, CRH-I<sup>125</sup> fue reconstituido con 13 ml de buffer RIA, chequeando en el contador gamma que la concentración de la solución estuviera entre 8000 y 10000 cpm/100 µl. Una vez finalizada la incubación del anticuerpo primario, se añadieron 100 µl de CRH-I<sup>125</sup> a la totalidad de los tubos, siendo agitados en Vortex por 15 segundos. A continuación, todos los tubos fueron cubiertos con parafilm e incubados nuevamente por 24 horas a 4°C (Tabla N° 2).

**g) Incubación del anticuerpo secundario:** a todos los tubos del RIA, excepto los TC, se les agregó 100 µl de GAR seguido por 100 µl de NRS, después de lo cual fueron agitados en vortex e incubados a temperatura ambiente durante 90 minutos (Tabla N° 2).

**h) Dilución y centrifugación de los tubos:** a la totalidad de los tubos, excepto los TC, se les agregó 500 µl de buffer RIA, después de lo cual fueron agitados en vortex. A continuación todos los tubos del RIA, a excepción de los TC, fueron centrifugados a 1700 x g por 20 minutos a 4°C. (Tabla N° 2).

**Tabla N° 2.** Tipo y volumen (en  $\mu\text{l}$ ) del contenido de cada uno de los tubos en la progresión del RIA.

Tubo	Contenido	Buffer RIA	Estándar o muestra	Anticuerpo primario	CRH $I^{125}$	GAR	NRS	Buffer RIA
TC-1 TC-2	cuentas totales				100			
NSB-1 NSB-2	uniones no específicas	200			100	100	100	500
TB-1 TB-2	uniones totales	100		100	100	100	100	500
7, 8	H		100	100	100	100	100	500
9, 10	G		100	100	100	100	100	500
11, 12	F		100	100	100	100	100	500
13, 14	E		100	100	100	100	100	500
15, 16	D		100	100	100	100	100	500
17, 18	C		100	100	100	100	100	500
19, 20	B		100	100	100	100	100	500
21, 22	A		100	100	100	100	100	500
23, 24	muestra		100	100	100	100	100	500
25, 26	muestra		100	100	100	100	100	500
27, 28	muestra		100	100	100	100	100	500
etc.	etc.		100	100	100	100	100	500

**i) Cuantificación en contador de radiación gamma:** Inmediatamente después de la centrifugación, a todos los tubos del RIA, excepto los TC, se les aspiró cuidadosamente el sobrenadante sin tocar el pellet adherido al fondo del tubo, luego de lo cual la totalidad de los tubos fueron colocados en el contador de radiación gamma (Figura N° 17) para medir las cpm de cada uno de los pellets.

#### 5.4.- Cálculo del resultado.

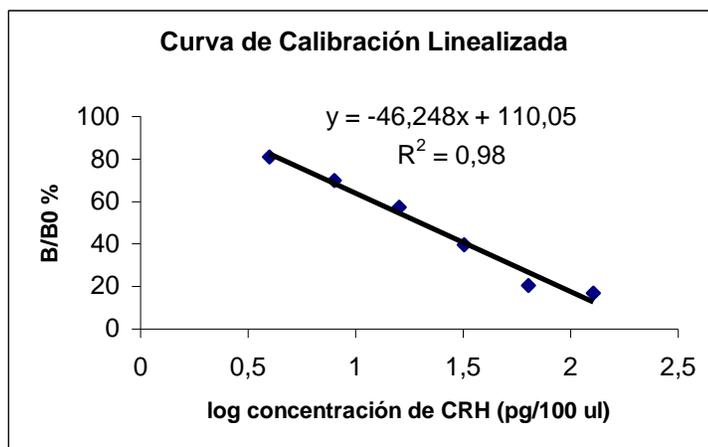
a) Se promediaron las cpm obtenidas de los tubos TB-1 y TB-2, así como las cpm de los tubos NSB-1 y NSB-2, resultando los promedios  $\overline{\text{TB}}$  y  $\overline{\text{NSB}}$ . La resta de  $\overline{\text{TB}}$  menos  $\overline{\text{NSB}}$  es igual a  $B_0$ , que corresponde al número de sitios de anticuerpos disponibles para la unión del péptido CRH, ya sea estándar o de la muestra. En términos matemáticos esto es:

$$\overline{\text{TB}} = \frac{\text{TB-1} + \text{TB-2}}{2} \quad \overline{\text{NSB}} = \frac{\text{NSB-1} + \text{NSB-2}}{2} \quad B_0 = \overline{\text{TB}} - \overline{\text{NSB}}$$

b) Luego, para los tubos que constituyen la curva estándar, se calculó el porcentaje de sitios de anticuerpos ocupados por el CRH con respecto a la totalidad de los sitios disponibles, lo cual corresponde a la expresión  $B/B_0(\%)$ , la que se calculó con la siguiente fórmula:

$$B/B_0(\%) = \frac{(\text{promedio de cpm del estándar}) - (\overline{\text{NSB}})}{B_0} \times 100$$

c) Para la construcción de la curva estándar o de calibración se graficó  $B/B_0(\%)$  en función del logaritmo de las concentraciones de CRH de los estándares (pg/100  $\mu$ l), luego de lo cual se trazó una línea de tendencia (regresión lineal) dada por la ecuación “ $y = -46,248x + 110,05$ ”. A partir de esta función se interpolaron los valores de las cpm de cada una de las muestras transformados en  $B/B_0(\%)$ . (Gráfico N° 1).



**Gráfico N° 1:** gráfico de dispersión con línea de tendencia dado por el logaritmo de las concentraciones de CRH estándar (pg/100  $\mu$ l) en el eje “x” versus  $B/B_0(\%)$  para cada uno de ellos en el eje “y”. Esta función lineal tiene un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,98$ .

d) Para determinar la concentración de CRH presente en las muestras se calculó B/B<sub>0</sub> (%) correspondiente a cada una de ellas. El valor obtenido se reemplazó en la ecuación de la curva estándar resultando la concentración de CRH (pg/100 µl) presente en las muestras. En términos matemáticos esto es:

$$y = - 46,248x + 110,05 \quad \log (\text{CRH pg}/100 \mu\text{L}) = \frac{\text{B}/\text{B}_0 (\%) - 110,05}{- 46,248}$$

## **6-. Cuantificación de la concentración sérica de corticosterona.**

### **6.1-. Toma de muestras.**

A los 40 días de edad, a partir de las 11:00 AM, ratas de los grupos **1, 2, 3** y **4** fueron llevadas en sus respectivas jaulas al Laboratorio de Hormonas y Receptores del INTA, en donde se obtuvo una muestra de sangre de cada animal mediante el mismo procedimiento descrito para la determinación de CRH plasmático con la salvedad que estos tubos Eppendorf no fueron heparinizados. Dichas muestras fueron refrigeradas durante 24 horas a 4°C, luego de lo cual, con una micropipeta a cada muestra se le extrajo el sobrenadante obteniendo aproximadamente 150 µl de suero. En un tubo Eppendorf previamente rotulado, cada muestra de suero fue almacenada al interior de un congelador Miele a -20°C hasta completar el número de muestras requerido por el experimento. Una vez completado el número de muestras, éstas fueron descongeladas en baño termostático a 37°C para posteriormente ser sometidas a un kit RIA Coat a Count Diagnostic Product Corporation (DPC) específico para corticosterona de rata según el protocolo descrito a continuación.

### **6.2-. Protocolo de kit RIA específico para Corticosterona.**

El Coat-A-Count para corticosterona de rata es un radioinmunoensayo en fase sólida en el cual, corticosterona de rata marcada con I<sup>125</sup> compete con corticosterona de la muestra, por sitios de anticuerpo, durante un tiempo determinado. Dado que el anticuerpo está adherido a la pared de un tubo de polipropileno, la simple decantación del sobrenadante es suficiente para terminar la competición y aislar la fracción de corticosterona radiomarcada unida al anticuerpo. Luego la radiación emitida por cada tubo es cuantificada mediante un contador gamma en cpm, las cuales, mediante una curva de calibración previamente construida, son convertidas en la concentración de corticosterona presente en la muestra. Este

kit DPC es altamente específico para corticosterona de rata, con muy baja reactividad cruzada para otros componentes presentes en las muestras de suero. Su sensibilidad es de aproximadamente 5,7 ng/ml lo que hace que los resultados de este ensayo sean muy confiables.

**a) Contenido del kit:** tubos de polipropileno de 12 x 75 mm revestidos internamente con anticuerpo para corticosterona de ratas (TRC1); 105 ml de corticosterona de rata marcada con I<sup>125</sup> (TRC2); 8 frascos calibradores o estándares de corticosterona de rata (RCC3-9,X) rotulados de la A, que corresponde a la unión máxima (MB), hasta la H, los cuales contienen, respectivamente, 0, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 y 2000 ng/ml de corticosterona.

**b) Preparación de la curva estándar o de calibración:** se cargaron en duplicado 8 TRC1, cada uno con 50 µl provenientes de los calibradores de la A hasta la H mencionados anteriormente (Tabla N° 3).

**Tabla N° 3.** Denominación, contenido y concentración de los tubos TRC1 con los cuales se construyó la curva de calibración del RIA coat a count específico para corticosterona de rata.

Tubos TRC1	Contenido de cada tubo	Concentración de corticosterona sérica (ng/ml)
A <sub>1</sub> – A <sub>2</sub> (MB)	50 µl RCC3-9, A	0
B <sub>1</sub> – B <sub>2</sub>	50 µl RCC3-9, B	20
C <sub>1</sub> – C <sub>2</sub>	50 µl RCC3-9, C	50
D <sub>1</sub> – D <sub>2</sub>	50 µl RCC3-9, D	100
E <sub>1</sub> – E <sub>2</sub>	50 µl RCC3-9, E	200
F <sub>1</sub> – F <sub>2</sub>	50 µl RCC3-9, F	500
G <sub>1</sub> – G <sub>2</sub>	50 µl RCC3-9, G	1000
H <sub>1</sub> – H <sub>2</sub>	50 µl RCC3-9, H	2000

**c) Control de calidad del RIA:** en tubos de polipropileno de 12 x 75 mm sin anticuerpo, se prepararon por duplicado los tubos correspondientes a Cuentas Totales (T-1 y T-2) y uniones no específicas (NSB-1 y NSB-2).

**d) Carga de las muestras:** se seleccionaron aleatoriamente 6 muestras de cada uno de los grupos experimentales (grupos 1, 2, 3 y 4). De cada una de estas muestras se cargaron en

duplicado 50  $\mu$ l de suero en tubos TRC1. Por su parte, a los tubos NSB se les agregó 50  $\mu$ l del calibrador A (MB).

**e) Incubación del trazador (TRC2):** a la totalidad de los tubos se les añadió 1 ml de TRC2, se agitaron en vortex y fueron incubados por 2 horas a temperatura ambiente. De esta manera quedaron constituidos todos los tubos del ensayo (Figura N° 4).

**Tabla N° 4.** Tipo y volumen del contenido de cada uno de los tubos en la progresión del RIA para corticosterona.

Tubos TRC1	Tubos sin Anticuerpo	Calibrador o muestra	TRC2
	T-1 , T-2		1 ml
	NSB-1 , NSB-2	50 $\mu$ l RCC3-9, A (MB)	1 ml
A <sub>1</sub> , A <sub>2</sub>		50 $\mu$ l RCC3-9, A (MB)	1 ml
B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub>		50 $\mu$ l RCC3-9, B	1 ml
C <sub>1</sub> , C <sub>2</sub>		50 $\mu$ l RCC3-9, C	1 ml
D <sub>1</sub> , D <sub>2</sub>		50 $\mu$ l RCC3-9, D	1 ml
E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub>		50 $\mu$ l RCC3-9, E	1 ml
F <sub>1</sub> , F <sub>2</sub>		50 $\mu$ l RCC3-9, F	1 ml
G <sub>1</sub> , G <sub>2</sub>		50 $\mu$ l RCC3-9, G	1 ml
H <sub>1</sub> , H <sub>2</sub>		50 $\mu$ l RCC3-9, H	1 ml
Muestra 1		50 $\mu$ l muestra 1	1 ml
Muestra 2		50 $\mu$ l muestra 2	1 ml
Muestra 3		50 $\mu$ l muestra 3	1 ml
Muestra 4, etc		50 $\mu$ l muestra 4	1 ml

**f) Cuantificación en contador de radiación gamma:** todos los tubos a excepción del T, fueron decantados totalmente por inversión, permitiendo el secado por 2 á 3 minutos, luego de lo cual fueron fuertemente sacudidos sobre un papel absorbente removiendo los residuos no adheridos a la pared del tubo. Inmediatamente después todos los tubos fueron cuantificados en contador de radiación gamma (Figura N° 17).



**Figura N° 17:** contador de radiación gamma Riastar Packard

### 6.3 Cálculo del resultado.

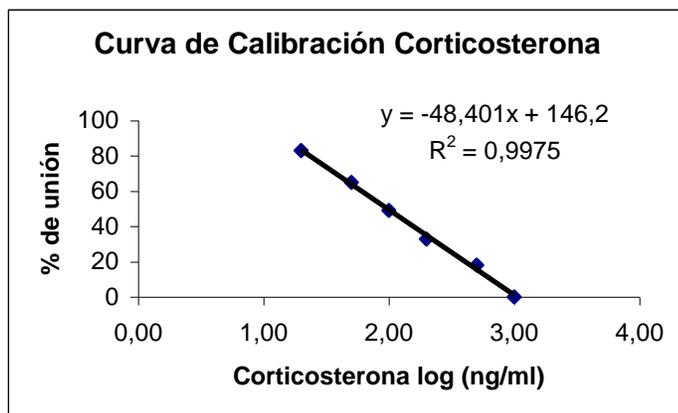
Para cada par de tubos que conformaron la curva de calibración se determinaron las cuentas netas, lo que corresponde al promedio de las cpm de cada par menos el promedio de las cpm de los tubos NSB. Esto es, para cualquier par de tubos calibradores se cumple que:

$$\text{cuentas netas} = (\text{cpm promedio de calibradores}) - (\text{cpm promedio NSB})$$

A continuación, se determinó la unión de TRC2 para cada par de tubos como porcentaje de la unión máxima, considerando como 100 % de unión al tubo A (MB) corregido por las cpm promedio de los tubos NSB (cuentas netas del MB), es decir:

$$\% \text{ de unión} = \frac{\text{cuentas netas calibrador}}{\text{cuentas netas del MB}} \times 100$$

Para la construcción de la curva estándar o de calibración se graficó el porcentaje de unión en función del logaritmo de las concentraciones de corticosterona de los calibradores o estándares (ng/ml) y se trazó una línea de tendencia (regresión lineal) dada por la ecuación “ $y = - 48,401x + 146,2$ ”. A partir de esta función se interpolaron los valores de cpm de cada una de las muestras transformados en porcentaje de unión. (Gráfico N° 2).



**Gráfico N° 2:** gráfico de dispersión con línea de tendencia dado por el logaritmo de las concentraciones de corticosterona estándar (ng/ml) en el eje “x” versus el porcentaje de unión para cada uno de ellos en el eje “y”. Esta función lineal tiene un coeficiente de correlación  $R^2 = 0.9975$ .

d) Para determinar la concentración de corticosterona presente en las muestras se calculó el porcentaje de unión para cada una de ellas. El valor obtenido se reemplazó en la ecuación de la curva estándar resultando la concentración de corticosterona (ng/ml) presente en las muestras. Es decir:

$$y = -48,401x + 146,2 \quad \log(\text{corticosterona ng/ml}) = \frac{(\% \text{enlace}) - 146,2}{-48,401}$$

## 7-. Análisis estadístico.

**7.1-. Presión arterial:** para este estudio el tamaño muestral se estimó en diecinueve individuos por grupo considerando un  $\alpha=5\%$ , un  $\delta=11$  mm Hg y potencia de 80%. Para el análisis estadístico de estos resultados se empleó el test t de Student que cuantificó la significancia estadística de la diferencia de presión arterial sistólica y diastólica entre el Grupo 1 y el Grupo 2. Los resultados son entregados como promedio  $\pm$  error estándar (EE).

**7.2-. Concentración plasmática de CRH:** para este estudio el tamaño muestral se estimó en nueve individuos por grupo considerando un  $\alpha=5\%$ , un  $\delta=1,9$  pg/100  $\mu$ l y potencia de 80%. Para el análisis estadístico de estos resultados se empleó el test t de Student que cuantificó la significancia estadística de la diferencia de concentración de CRH plasmático entre el Grupo 1 y el Grupo 2. Los resultados son entregados como promedio  $\pm$  EE.

**7.3-. Concentración sérica de Corticosterona:** para este estudio el tamaño muestral se estimó en seis individuos por grupo considerando un  $\alpha=5\%$ , un  $\delta=20$  ng/ml y potencia de 80%. Para el análisis estadístico de estos resultados se empleó un Diseño Factorial tipo I (ANOVA de dos factores) para probar el modelo lineal  $Y_{ijk} = \mu + A_i + T_j + (A \times T)_{ij} + \xi_{ijk}$ , donde “ $Y_{ijk}$ ” es el nivel de corticosterona en el individuo k, “ $A_i$ ” es el efecto de la alimentación i, “ $T_j$ ” es el efecto del tratamiento j,  $(A \times T)_{ij}$  es efecto de la interacción entre “ $A$ ” y “ $T$ ”, y “ $\xi_{ijk}$ ” el efecto residual. Este ANOVA cuantificó la significancia estadística de la diferencia de corticosterona sérica entre los grupos **1** y **2**, por un lado, y entre los grupos **3** y **4**, por otro. Además verificó la existencia de interacción entre el tratamiento nutricional y el tratamiento con dexametasona. Los resultados son entregados como promedio  $\pm$  EE.

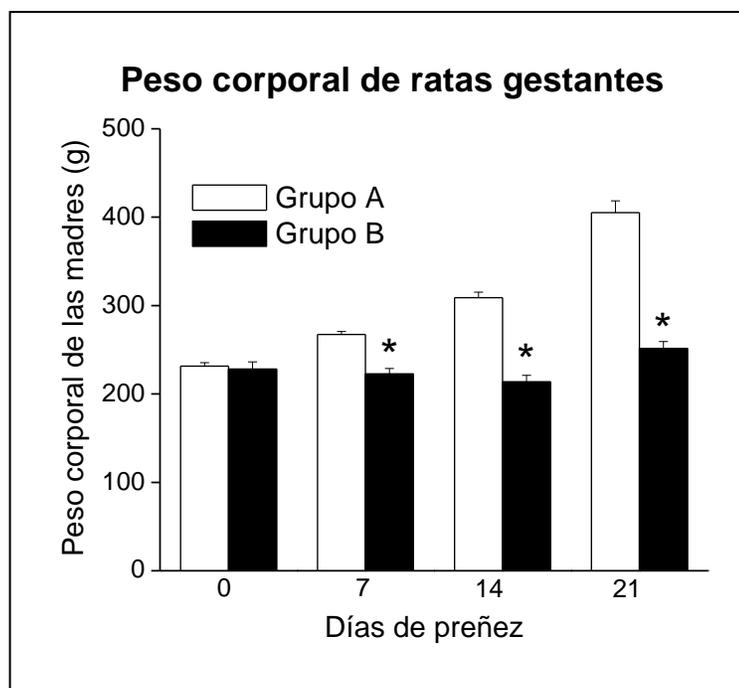
Diseño Factorial tipo I (efectos fijos)		Tratamiento	
		sin dexametasona	con dexametasona
Alimentación	Eutróficas	<b>1</b>	<b>3</b>
	Desnutridas	<b>2</b>	<b>4</b>

En el análisis estadístico también se incluyó el peso corporal de las madres durante la preñez, así como del peso corporal de las crías hasta los 40 días de edad. Para este propósito se utilizó el test t de Student que cuantificó la significancia estadística de la diferencia entre el Grupo **A** y el Grupo **B**, y entre el Grupo **1** y el Grupo **2**. Los resultados son entregados como promedio  $\pm$  EE.

## VI. RESULTADOS

### 1- Peso corporal de las ratas gestantes:

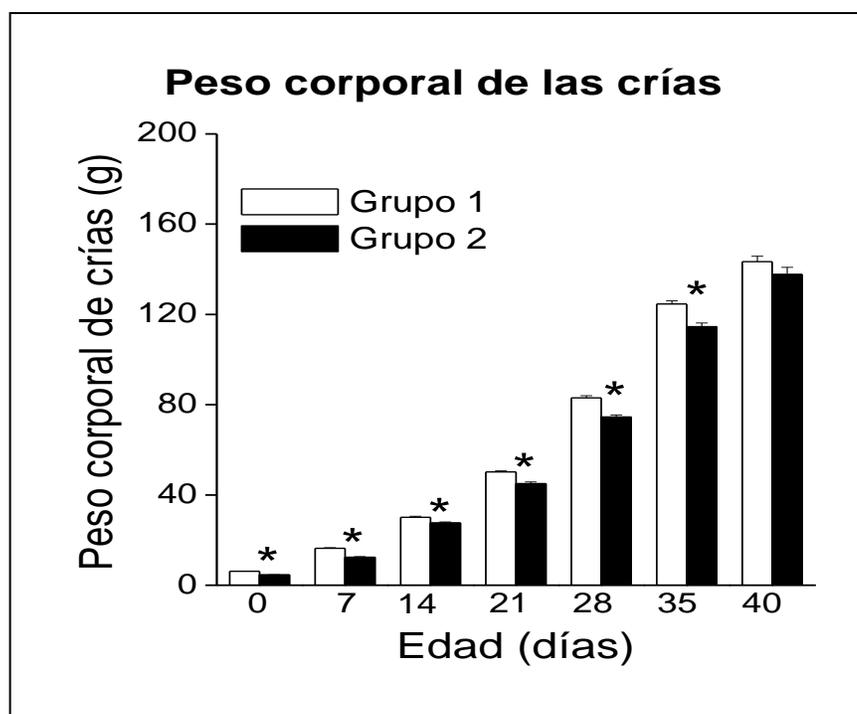
Los grupos **A** (ratas gestantes alimentadas *ad libitum*) y **B** (ratas gestantes con restricción calórico-proteica) presentan una diferencia significativa en la evolución del peso corporal a lo largo de la preñez. Así, mientras en el grupo **A** existe un aumento persistente hasta llegar a un promedio de 420 g al término de la tercera semana de preñez, el grupo **B** muestra una leve disminución durante la primera y segunda semana para aumentar de peso recién durante la tercera semana llegando a un promedio de 278 g (Gráfico N° 3).



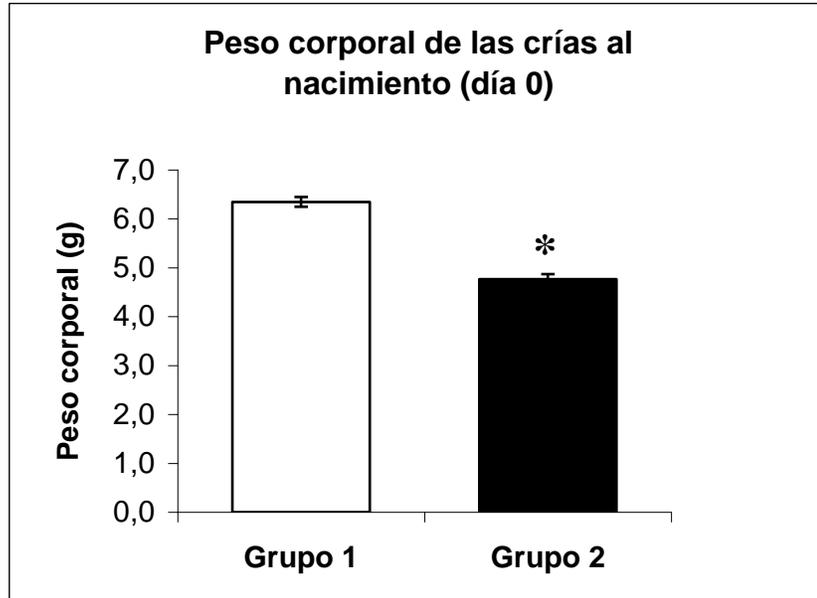
**Gráfico N° 3:** Evolución del peso corporal de ratas gestantes con dieta *ad libitum* (grupo **A**) y con restricción alimentaria (grupo **B**). Los valores medidos representan el promedio  $\pm$  EE a los 0, 7, 14, y 21 días de preñez.  $n = 10$  hembras por grupo. Los asteriscos indican una diferencia significativa en los pesos corporales de ratas desnutridas respecto de las normales (\* $P < 0.001$ , test t de Student).

## 2-. Peso corporal de las crías:

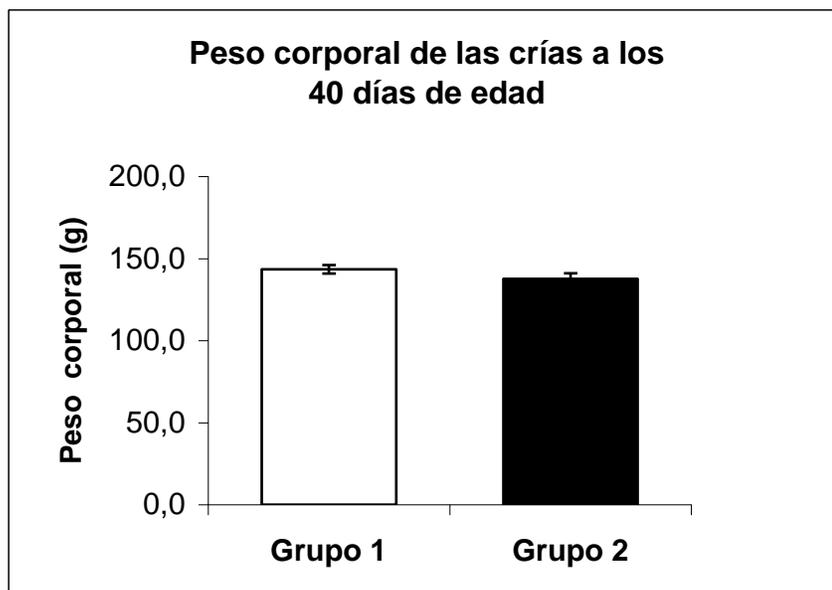
Los grupos 1 (ratas eutróficas) y 2 (ratas sometidas a restricción calórico-proteica prenatal) presentan una diferencia estadísticamente significativa del peso corporal a los 0, 7, 14, 21, 28 y 35 días de vida postnatal. No obstante, al día 40 esta diferencia ya no es significativa (Gráficos N° 4, N° 5 y N° 6).



**Gráfico N° 4:** Evolución del peso corporal durante la vida postnatal de las crías del grupo 1 y las crías del grupo 2. Los valores medidos representan el promedio  $\pm$  EE a los 0, 7, 14, 21, 28, 35, y 40 días de edad.  $n = 64$  crías por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa entre las crías del grupo 1 y las del grupo 2. (\* $P < 0.001$ , test t de Student).



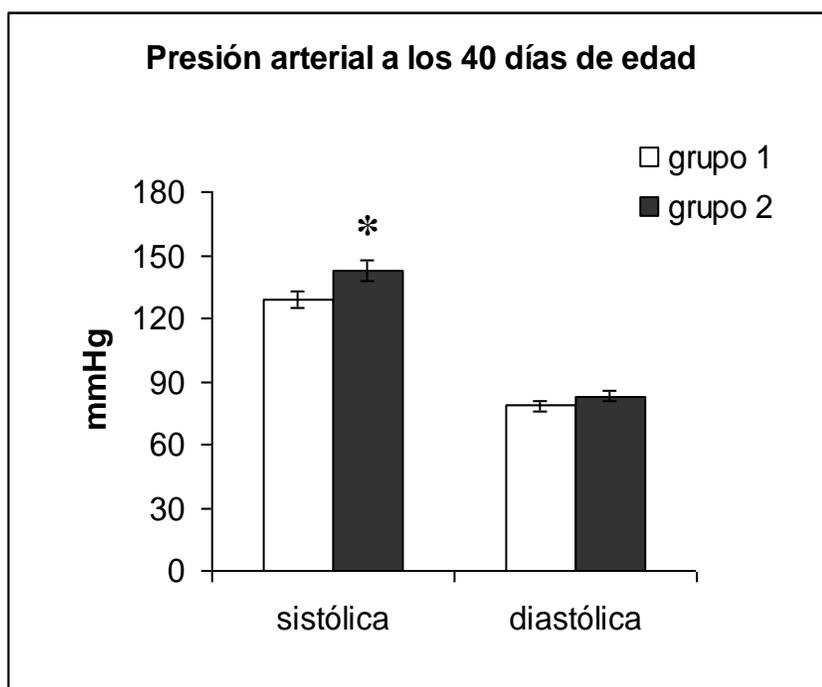
**Gráfico N° 5:** Peso corporal al nacimiento (día 0 de vida postnatal) del grupo 1 y del grupo 2. Los valores medidos representan el promedio  $\pm$  EE.  $n = 64$  crías por grupo. El asterisco indica diferencia significativa entre las crías del grupo 1 y las del grupo 2. (\* $P < 0.001$ , test t de Student).



**Gráfico N° 6:** Peso corporal al día 40 de vida postnatal del grupo 1 y del grupo 2. Los valores medidos representan el promedio  $\pm$  EE.  $n = 64$  crías por grupo. No hay diferencia estadísticamente significativa entre las crías de ambos grupos (test t de Student).

### 3-. Presión Arterial:

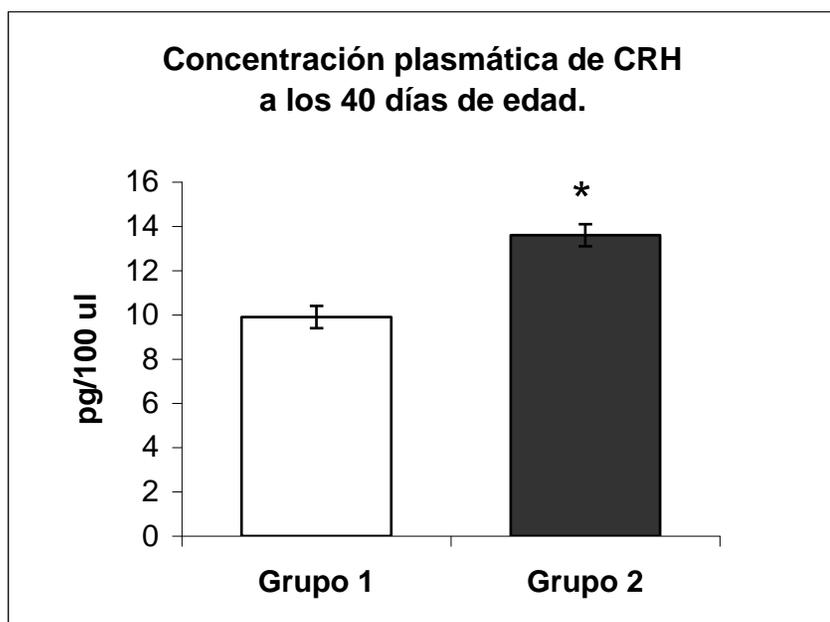
A los 40 días de edad existe una diferencia estadísticamente significativa en la presión arterial sistólica entre las ratas del grupo 1 ( $128.6 \pm 3.90$  mm Hg) versus las del grupo 2 ( $142.8 \pm 5.16$  mm Hg). En el caso de la presión arterial diastólica la diferencia entre el grupo 1 ( $78.2 \pm 2.28$  mm Hg) y el grupo 2 ( $83.1 \pm 2.69$  mm Hg) no es significativa (Gráfico N° 7).



**Gráfico N° 7:** Presión arterial sistólica y diastólica al día 40 de vida postnatal del grupo 1 y del grupo 2. Los valores medidos representan el promedio  $\pm$  EE. n=19 crías por grupo. El asterisco indica diferencia significativa entre el grupo 1 y el grupo 2. (\*P< 0.05, test t de Student).

#### 4-. Concentración plasmática de CRH:

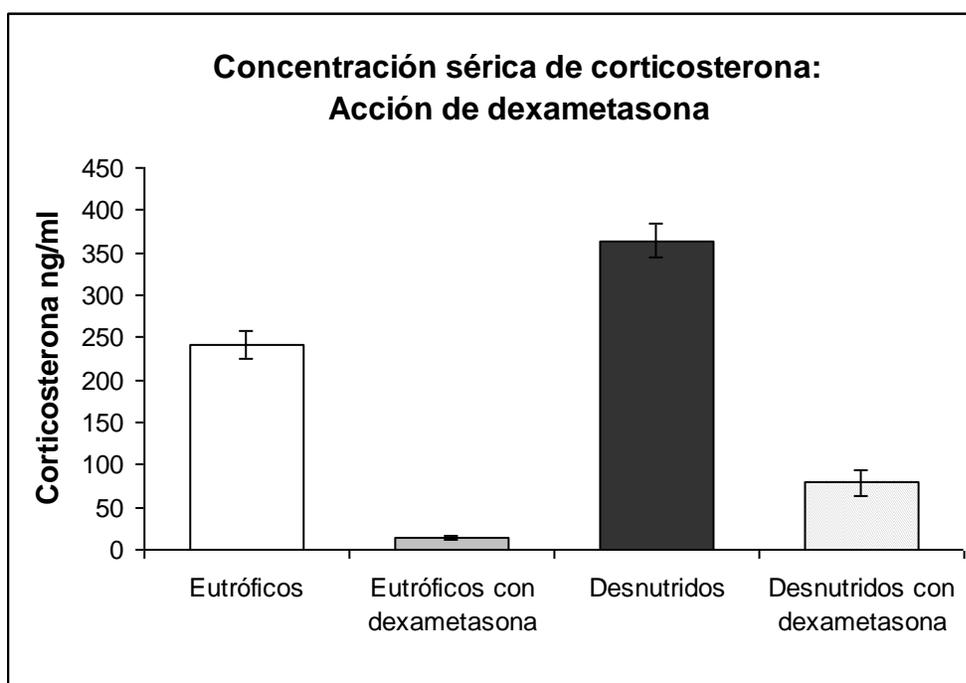
A los 40 días de edad existe una diferencia significativa en la concentración plasmática de CRH entre las ratas del grupo 1 ( $9.9 \pm 0.5$  pg/100  $\mu$ l) versus las del grupo 2 ( $13.6 \pm 0.53$  pg/100  $\mu$ l) como lo muestra el gráfico N° 8.



**Gráfico N° 8:** Concentración plasmática de CRH al día 40 de vida postnatal del grupo 1 y del grupo 2. Los valores medidos representan el promedio  $\pm$  EE. n = 9 crías por grupo. Los asteriscos indican diferencia significativa entre el grupo 1 y el grupo 2. (\*P < 0.001, test t de Student).

## 5-. Efecto de la dexametasona en la concentración sérica de corticosterona:

A los 40 días de edad la concentración sérica de corticosterona es significativamente mayor ( $P < 0,0001$ ) en las ratas prenatalmente desnutridas (grupo 2) respecto de los controles eutróficos (grupo 1). Además la corticosterona sérica es significativamente mayor ( $P < 0,0001$ ) en los animales prenatalmente desnutridos tratados con dexametasona (grupo 4) respecto de los eutróficos tratados con dexametasona (grupo 3). El Anova de dos factores determinó que existe una interacción estadísticamente significativa entre condición nutricional y tratamiento con dexametasona. ( $F=4,78$ ;  $P=0,0408$ ), lo que explica que el efecto inhibitorio de la dexametasona sobre la corticosterona sérica sea menos marcado en los animales prenatalmente desnutridos. Esta interacción es responsable del 1,83 % de la varianza total, así como la dieta es responsable del 37,19 % ( $F=97,14$ ) del total de la varianza, y el tratamiento con dexametasona del 53,32 % ( $F=139,26$ ).



**Gráfico N° 9:** Concentraciones séricas de corticosterona a los 40 días de edad en los grupos 1, 3, 2 y 4. Los valores medidos representan el promedio  $\pm$  EE.  $n = 6$  individuos por grupo. Diseño Factorial Tipo 1 indica interacción significativa entre los factores dieta y dexametasona ( $F=4,78$ ;  $P=0,0408$ ).

## VII. DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio confirman que la restricción calórico-proteica materna durante toda la preñez tiene un efecto determinante en la evolución del peso corporal, tanto de las ratas gestantes, como de su descendencia. Así, las crías que sufrieron desnutrición prenatal presentaron un peso corporal significativamente más bajo desde el nacimiento hasta la quinta semana de vida postnatal, lo que refleja un retraso del crecimiento intrauterino de estos animales. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por otros investigadores que usaron modelos de desnutrición prenatal basados en restricción proteica severa (Langley-Evans y Jackson., 1994; Vehaskari *et al.*, 2001) y calórico-proteica (Pérez *et al.*, 2002; Woodall *et al.*, 1996; Olausson *et al.*, 2003) en ratas. No obstante, en el presente estudio la diferencia de peso corporal a los 40 días de edad ya no es estadísticamente significativa, lo cual pone de manifiesto que las crías desnutridas prenatalmente presentan un crecimiento compensatorio dado por una mayor ganancia de peso durante las primeras semanas de vida postnatal.

Además, las ratas descendientes de madres sometidas a restricción calórico-proteica presentaron una presión arterial sistólica elevada a los 40 días de edad a pesar del periodo de recuperación nutricional con nodriza y alimentación *ad libitum*, coincidiendo con los resultados informados por otros autores que indujeron hipertensión arterial mediante desnutrición prenatal (Pérez *et al.*, 2002; Woodall *et al.*, 1996). Debido a que en ratas las mediciones de presión arterial a muy temprana edad son difíciles de realizar, el momento exacto de la aparición de la hipertensión no está bien definido. De este modo, aunque los mecanismos que conducen a hipertensión pueden tener su origen en la vida prenatal, los neonatos pueden no ser hipertensos. En efecto, en los modelos de restricción proteica los primeros registros de presión arterial elevada se han detectado alrededor del destete, quedando ya establecida la hipertensión en ratas de 8 semanas de vida (Langley-Evans y Jackson, 1994; Vehaskari *et al.*, 2001). Por otro lado, en ovejas preñadas con restricción alimentaria se ha medido la presión arterial fetal en la última etapa de la gestación, encontrándose valores de presión normales o aún disminuidos (Hawkins *et al.*, 2000a), a pesar de que las crías son hipertensas a los 4 meses de vida postnatal (Hawkins *et al.*, 2000b). De estos resultados se desprende que el bajo peso de nacimiento inducido por desnutrición prenatal está asociado con presión arterial sistólica elevada en la vida postnatal. Estos modelos experimentales concuerdan con estudios epidemiológicos hechos en más de 30 poblaciones humanas diferentes que han establecido que

el bajo peso de nacimiento en niños de término está asociado con presión arterial elevada en la juventud y vida adulta (Law y Shiell, 1996). Debido a que el peso de nacimiento es en gran medida determinado por el suministro de nutrientes al feto, estos estudios epidemiológicos han llevado a la hipótesis de que la hipertensión se puede generar *in utero* como resultado de la desnutrición fetal (Barker, 1995). Al respecto, se ha sugerido que cambios endocrinos u otros cambios fisiológicos involucrados en la adaptación fetal a la desnutrición persisten y predisponen al desarrollo de la hipertensión adulta, fenómeno que forma parte del proceso denominado programación fetal (Lucas, 1991). Una vez manifestada la hipertensión, que es programada prenatalmente, ésta parece persistir a lo largo de la vida del animal (Manning y Vehaskari, 2001; Vehaskari *et al.*, 2001; Woods *et al.*, 2004; Wintour *et al.*, 2003).

Por otro lado, en este trabajo se demostró que el neuropéptido CRH, uno de los principales activadores del eje HHA, presenta una concentración plasmática aumentada en los animales de 40 días de edad que experimentaron desnutrición prenatal. Si bien, aún no se ha cuantificado la liberación hipotalámica de CRH es posible que sus incrementados niveles en la circulación sistémica reflejen una mayor liberación de este neuropéptido desde el hipotálamo, estructura del sistema nervioso central donde se produce la mayor proporción de CRH. Esta probable hiperactividad del hipotálamo concordaría con un estudio reciente, el cual muestra que la expresión génica para RNAm de CRH hipotalámico está aumentada en animales que fueron sometidos a restricción calórico-proteica prenatal (Pérez *et al.*, 2004), lo que sugiere que el eje HHA se encuentra hiperactivo en la vida postnatal de los animales prenatalmente desnutridos que son hipertensos a los 40 días de edad. En estos animales la actividad bioeléctrica de las neuronas del PVN se encuentra aumentada respecto de los controles eutróficos (Pérez *et al.*, 2006). Junto a lo anterior, cabe destacar que en sendos estudios no relacionados con desnutrición prenatal, ratas espontáneamente hipertensas (Krukoff *et al.*, 1999) y humanos con hipertensión primaria (Goncharuk *et al.*, 2002) también presentan una sobreexpresión del RNAm para CRH en el PVN, hecho que también apunta a una hiperactividad del eje HHA. Es importante señalar que CRH no es exclusivo del sistema nervioso central, sino que también ha sido encontrado en tejidos periféricos tales como médula adrenal, testículos, ovarios, tracto gastrointestinal, páncreas, endometrio, placenta y en el citoplasma de células inflamatorias como macrófagos, linfocitos y neutrófilos (Mastorakos *et al.*, 2006). No obstante, hasta la fecha la literatura no informa de CRH periférico incrementado en individuos prenatalmente desnutridos.

En este estudio, la desnutrición calórico-proteica materna indujo un aumento en la corticosterona sérica de la descendencia a los 40 días de edad. Valores de corticosterona circulante aumentados en animales que sufrieron desnutrición prenatal han sido reportados en otros modelos semejantes (Olausson *et al.*, 2003; Söhlstrom *et al.*, 2000). En ratas de 60 a 70 días de edad, cuyas madres fueron sometidas a restricción proteica severa, corticosterona también se encuentra aumentada (Rosene *et al.*, 2004). Sin embargo, en ratas con restricción proteica menos severa que el 9% no se han reportado cambios en los niveles de corticosterona respecto de los controles eutróficos. Además, evidencias recientes muestran que ratas desnutridas prenatalmente ya poseen niveles de corticosterona elevados al segundo día de vida postnatal (Pérez *et al.*, 2004). Más aún, ratas jóvenes SHR presentan elevados niveles de corticosterona (Hashimoto *et al.*, 1989). A este respecto, se ha especulado que la rata espontáneamente hipertensa es algo más que un modelo genético puro de hipertensión, puesto que las crías de esta cepa presentan retardo del crecimiento intrauterino, evidenciado por un bajo peso de nacimiento (Iwase *et al.*, 1995). Por otro lado, estudios epidemiológicos en humanos han asociado bajo peso de nacimiento con alza del cortisol plasmático basal, lo cual podría estar ligado a un incremento en la actividad del eje HHA en la vida postnatal de estos individuos (Phillips, *et al.*, 2000; Phillips, *et al.*, 1998).

Los valores de corticosterona sérica obtenidos en el presente trabajo muestran que los animales sometidos a desnutrición intrauterina presentan una hiperactividad del eje HHA, evidenciable a los 40 días de vida postnatal. Al respecto, como ya ha sido señalado, la restricción del crecimiento fetal conduce a una reducción del feedback negativo que ejercen los glucocorticoides en el eje HHA (Seckl y Walker, 2001), por una serie de eventos secuenciales que incluyen: (i) actividad disminuida de la enzima placentaria  $11\beta$ -HSD2, incrementando la exposición del cerebro fetal a glucocorticoides de origen materno (Langley-Evans *et al.*, 1996(b); Langley-Evans *et al.*, 1996c); (ii) esto conduce a una disminución de la expresión de los receptores de glucocorticoides durante la vida intrauterina en regiones relacionadas con la regulación del eje HHA, tales como hipotálamo (Bertram *et al.*, 2001), hipófisis (Hawkins *et al.*, 2001) e hipocampo (Lesage *et al.*, 2001), estructuras que muestran alta densidad de sitios de unión a corticosteroides (Levitt *et al.*, 1996; Welberg *et al.*, 2001).

A las 14 horas post inyección de dexametasona, la concentración sérica de corticosterona disminuyó tanto en las ratas eutróficas como en las sometidas a desnutrición prenatal. Sin embargo, su efecto supresor a nivel de la corteza adrenal fue significativamente

menor en las ratas desnutridas debido, probablemente, a la disminución que tienen estos animales en el número de receptores de glucocorticoides (evidenciado por una disminución de la expresión génica de estos receptores) en regiones involucradas en el control del eje HHA tales como hipocampo, hipotálamo e hipófisis. Esto traería como consecuencia una disminución de la sensibilidad de estos tejidos a corticosterona alterando el control por feedback negativo. La dexametasona también presenta un efecto inhibitor de la liberación de corticosterona en humanos saludables, sin embargo, la acción de este glucocorticoide sintético es menos marcada en pacientes con depresión clínica (Gold *et al.*, 1986), en nefrópatas y cardiopatas hospitalizados en Unidades de Cuidados Intensivos (Reincke *et al.*, 1993), sujetos que también presentan niveles basales de cortisol aumentados.

En resumen, la desnutrición calórico-proteica intrauterina induce una disminución en el número de receptores para glucocorticoides, hecho que programaría un eje HHA que ya se muestra hiperactivo a los 40 días de edad. En efecto, los resultados obtenidos en el presente estudio, revelan una mayor actividad del eje HHA de los animales prenatalmente desnutridos, la cual se manifiesta tanto por las mayores concentraciones sanguíneas de CRH y corticosterona, como por la menor reactividad del eje HHA a la acción de un glucocorticoide exógeno.

La relación entre desnutrición prenatal y posterior hipertensión podría estar en la base de un eje HHA que se vuelve hiperactivo en la vida postnatal. Como se mencionó anteriormente, neuronas CRHérgicas del PVN inervan núcleos noradrenérgicos del tronco cerebral implicados en la función cardiovascular ( $A_1$ ,  $A_2$  y LC), y recíprocamente neuronas noradrenérgicas conectan con el PVN. En ratas desnutridas prenatalmente que presentan hipertensión a los 40 días de vida postnatal la actividad bioeléctrica de las neuronas del PVN y del LC está aumentada respecto de los controles eutróficos (Pérez *et al.*, 2006). Esto muestra un loop excitatorio hiperactivo entre ambos núcleos, lo cual implica una serie de fenómenos paralelos que podrían conducir a un cuadro de hipertensión arterial persistente. Por un lado, la mayor actividad del PVN resulta en una incrementada liberación de CRH, llevando a un aumento de la corticosterona circulante, la que actúa directamente en receptores vasculares para glucocorticoides (Yang y Shang, 2004), que responden con una actividad vasomotora aumentada. Junto a esto, la mayor actividad del NPH incrementa la actividad del sistema nervioso simpático (Akine *et al.*, 2003). Por otro lado, la mayor actividad neuronal del LC de estos animales resulta en una incrementada liberación de noradrenalina (Soto-Moyano *et al.*,

1995), llevando a una mayor actividad del sistema nervioso simpático con el consiguiente aumento en la liberación de adrenalina (Drolet y Gauthier, 1985), o bien, inhibiendo la descarga neuronal del NTS, lo cual deprime el reflejo barosensorial que actúa oponiéndose a las alzas de presión arterial (Chan *et al.*, 1992). En todas estas situaciones se generan incrementos de presión arterial que podrían explicar la causa del estado hipertensivo que presentan los animales sometidos a desnutrición prenatal. En todo caso no se ha logrado demostrar que alguno de estos mecanismos sea responsable del cuadro de hipertensión programado *in utero*.

Se ha documentado que el riñón también puede jugar un rol importante en la programación prenatal de la hipertensión. En efecto, se ha observado un deterioro progresivo de la función renal, con disminución del 28% en el número de glomérulos renales (Vehaskari *et al.*, 2001) en las ratas con hipertensión consecutiva a restricción proteica prenatal, aduciéndose que el estado hipertensivo podría ser consecuencia de adaptaciones hemodinámicas frente a la nefrogénesis reducida causada por el retardo del crecimiento intrauterino (Nwagwu *et al.*, 2000). Otros estudios sugieren que en este modelo de hipertensión están involucrados efectos a largo plazo en el sistema renina-angiotensina, ya que la administración de un antagonista de receptores AT<sub>1</sub> para angiotensina durante la vida postnatal previene o impide el desarrollo de hipertensión (Sherman y Langley-Evans, 2000). Los factores renales envueltos en la hipertensión arterial de origen fetal no fueron abordados por el presente estudio, aunque sin duda son de gran importancia. No obstante lo anterior, los resultados de este trabajo, en cuanto a los aumentos de CRH y corticosterona detectables en la circulación sanguínea de ratas sometidas a desnutrición intrauterina, entrega importantes antecedentes respecto de marcadores que, tal vez, en un futuro puedan utilizarse como diagnóstico prematuro de hipertensión en individuos que nacieron con déficit de peso corporal y, de esta manera, establecer una terapia que revierta o neutralice el desarrollo de uno de los cuadros que cobra mayor cantidad de vidas en el mundo entero.

## VIII. CONCLUSIONES

1-. La restricción calórico-proteica (40% del consumo *ad libitum*) de las ratas durante toda la preñez, además de llevar a una baja ganancia de peso de ellas mismas, produce un bajo peso de nacimiento de su descendencia respecto de los controles eutróficos.

2-. Las ratas de 40 días de edad que fueron sometidas a restricción calórico-proteica prenatal tienen una presión arterial sistólica significativamente mayor respecto de los controles eutróficos. En el caso de la presión arterial diastólica esta diferencia no es significativa entre ambos grupos.

3-. Las ratas de 40 días de edad que fueron sometidas a restricción calórico-proteica prenatal tienen una concentración plasmática de CRH significativamente mayor respecto de los controles eutróficos.

4-. Las ratas de 40 días de edad que fueron sometidas a restricción calórico-proteica prenatal tienen una concentración sérica de corticosterona significativamente mayor respecto de los controles eutróficos.

5-. En las ratas de 40 días de edad que fueron sometidas a restricción calórico-proteica prenatal, la dexametasona tiene un efecto inhibitorio significativamente menor sobre la corticosterona sérica respecto de los controles eutróficos.

6-. El hecho que las ratas de 40 días de edad prenatalmente desnutridas presenten, respecto de los controles eutróficos, mayor concentración sérica de corticosterona, menor reactividad de ésta a la acción de glucocorticoides exógenos y mayor concentración plasmática de CRH, sugiere fuertemente que el eje HHA se encuentra hiperactivo en la vida postnatal de estos animales, debido, probablemente, a la “programación” prenatal de un menor número de receptores hipotalámicos para glucocorticoides reportados en la literatura, lo cual implicaría una disminución de la retroalimentación negativa ejercida por los glucocorticoides endógenos.

## IX. BIBLIOGRAFIA

AKINE, A.; MONTANARO, M.; ALLEN, A. 2003. Hypothalamic paraventricular nucleus inhibition decreases renal sympathetic nerve activity in hypertensive and normotensive rats. *Auton. Neurosci.* 108:17-21.

AL'ABSI, M.; ARNETT, D. 2000. Adrenocortical response to psychological stress and risk for hypertension. *Biomed. Pharmacother.* 54:234-244.

ASTON-JONES, G.; SHIPLEY, M.; CHOUVET, G.; ENNIS, M.; VAN BOCKSTAELE, E.; PIERIBONE, B.; SHIEKHATTAR, R.; AKAOKA, H.; DROLET, G.; ASTIER, B.; CHARLETY, P.; VALENTINO, R.; WILLIAMS, J. 1991. Afferent regulation of locus coeruleus neurons: Anatomy, physiology and pharmacology. *Prog. Brain Res.* 85:47-75.

BARKER, D. 1994. *Mothers, babies and disease in later life.* London: BMJ Publishing Group.

BARKER, D. 1995. Fetal origins of coronary heart disease. *Br. Med. J.* 311:171-174.

BARKER, D.; BULL, A.; OSMOND, C.; SIMMONDS, S. 1990. Fetal and placental size and risk of hypertension in adult life. *Br. Med. J.* 301:259-263.

BARKER, D.; OSMOND, C.; WINTER, P.; MARGETTS, B. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2:577-580.

BEITENS, I.; BAYARD, F.; ANCES, I.; KOWARSKY, A.; MIGEON, C. 1973. The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr. Res.* 7:509-519.

BENEDIKTSSON, R.; BRENNAND, J.; TIBI, L.; CALDER, A.; SECKL, J.; EDWARDS, C. 1995. Fetal osteocalcin levels are related to placental 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase activity. *Clin. Endocrinol.* 42:551-555.

BENEDIKTSSON, R.; CALDER, A.; EDWARDS, C.; SECKL, J. 1997. Placental 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2 is the placental barrier to maternal glucocorticoids: Ex vivo studies. *Clin. Endocrinol.* 46:161-166.

BENEDIKTSSON, R.; LINDSAY, R.; NOBLE, J.; SECKL, J.; EDWARDS, C. 1993. Glucocorticoid exposure in utero: A new model for adult hypertension. *Lancet* 341:339-341.

BERRY, L.; POLK, D.; IKEHAMI, M.; JOBE, A.; PADBURY, J.; EERVIN, M. 1997. Preterm newborn lamb renal and cardiovascular responses after fetal or maternal antenatal betamethasone. *Am. J. Physiol.* 41:R1972-R1979.

BERTRAM, C.; HANSON, M. 2001. Animal models and programming of metabolic syndrome. *Br. Med. Bull.* 60:103-121.

BERTRAM, C.; TROWERN, A.; COPIN, N.; JACKSON, A.; WHORWOOD, C. 2001. The maternal diet during pregnancy programs altered expression of the glucocorticoid receptor and type 2 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase: potential molecular mechanisms underlying the programming of hypertension in utero. *Endocrinology* 142: 2841-2853.

BJORNTORP, P.; HOLM, G.; ROSMOND, R.; FOLKOW, B. 2000. Hypertension and metabolic syndrome: closely related central origin? *Blood Press.* 9:71-82.

BROWN, M.; FISHER, L. 1988. Autonomic and cardiovascular effect of corticotropin-releasing-factor in the spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 441:33-40.

CAMPBELL, A.; MURPHY, B. 1977. The maternal-fetal cortisol gradient during pregnancy and at delivery. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 45:435-440.

CHALNERS, J.; PILOWSKY, P. 1991. Brain stem and bulbospinal neurotransmitter system in the control of blood pressure. *J. Hypertens.* 9:675-694.

CHAN, J.; JANG, S.; CHAN, S. 1992. Inhibition by locus coeruleus on the baroreceptor reflex response by locus coeruleus in the rat. *Neurosci. Lett.* 144:225-228.

CHIDA, K.; KAWAMURA, H.; HATANO, M. 1983. Participation of the nucleus locus coeruleus in DOCA-salt hypertensive rats. *Brain Res.* 273:53-58.

CINTRA, A.; SOLFRINI, V.; BUNNEMANN, B.; OKRET, S.; BORTOLOTTI, F.; GUSTAFSSON, J.; FUXE, K. 1993. Prenatal development of glucocorticoid receptor gene expression and immunoreactivity in the rat brain and pituitary gland: A combined in situ hybridization and immunocytochemical analysis. *Neuroendocrinology* 57:1133-1147.

COLE, T.; BLENDY, J.; MONAGHAN, A.; SCHMID, W.; AGUZZI, A.; SCHUTZ, G. 1995. Molecular genetic analysis of glucocorticoid signaling during mouse development. *Steroids* 60:93-96.

CROWE, C.; DANDEKAR, P.; FOX, M.; DHINGRA, K.; BENNET, L.; HANSON, M. 1995. The effects of anaemia on heart placenta and body weight, and blood pressure in fetal and neonatal rats. *J. Physiol.* 488:515-519.

CUNNINGHAM, E.; SAWCHENKO, P. 1988. Anatomical specificity of noradrenergic input to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* 274:60-76.

CURTIS, A.; LECHNER, S.; PAVCOVICH, L.; VALENTINO, R. 1997. Activation of the locus coeruleus noradrenergic system by intracoerulear microinfusion of corticotropin-releasing-factor: Effects on discharge rate, cortical norepinephrine levels and cortical electroencephalographic activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 281:163-172.

DAVE-SHARMA, S.; WILSON, R.; HARRISON, M.; NEWFIELD, R.; AZAR, M.; KROZOWSKI, Z.; FUNDER, J.; SHACKLETON, C.; BRADLOW, H.; WEI, J.; HERTECANT, J.; MORAN, A.; NEIBERGER, R.; BALFE, J.; FATTAN, A.; DANEMAN, D.; AKKURF, H.; DESANTIS, C.; NEW, M. 1998. Extensive personal experience:

Examination of genotype and phenotype relationships in 14 patients with apparent mineralocorticoid excess. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:2244-2254.

DAY, T.; FERGUSON, A.; RENAUD, L. 1984. Facilitatory influence of noradrenergic afferents on the excitability of rat paraventricular nucleus neurosecretory cells. *J. Physiol.* 355: 237-249.

DÍAZ, R.; BROWN, R.; SECKL, J. 1998. Ontogeny of RNAm encoding glucocorticoid and mineralocorticoid receptors and 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in rat brain development reveal complex control of glucocorticoid action. *J. Neurosci.* 18: 2570-2580.

DROLET, G.; GAUTHIER, P. 1985. Peripheral and central mechanism of the pressor response elicited by stimulation of the locus coeruleus in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 63:599-605.

DUPOUY, J.; CHATELAIN, A.; BOUDOURESQUE, F.; CONTE-DEVOLX, B.; OLIVER, C. 1987. Effects of chronic maternal dexamethasone treatment on the hormones of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the rat fetus. *Biol. Neonate* 52:216-222.

ECKART, K.; RADULOVIC, J.; RADULOVIC, M.; JAHN, O.; BLANK, T.; STIEDL, O.; SPIESS, J. 1999. Actions of CRF and its analogs. *Curr. Med. Chem.* 11:1035-1053.

EDWARDS, C.; BENEDIKTSSON, R.; LINDSAY, R.; SECKL, J. 1993. Dysfunction of the placental glucocorticoid barrier: link between the fetal environment and adult hypertension? *Lancet* 341:355-357.

FOWDEN, A.; GIUSSANI, D.; FORHEAD, A. 2005. Endocrine and metabolic programming during intrauterine development. *Early Hum. Dev.* 81:723-734.

GATFORD, K.; WINTOUR, E.; DE BLASIO, M.; OWENS, J.; DODIC, M. 2000. Differential timing for programming of glucosa homeostasis, sensitivity to insulin and blood pressure by in utero exposure to dexamethasone in sheep. *Clin. Sci.* 98:553-560.

GENUTH, S. 2001. La corteza suprarrenal. En: Robert M. Berne; Matthew N. Levy., editores. Fisiología. Tercera edición. Madrid. España: Editorial Harcourt. p:560-561.

GOLD, P.; LORIAUX, D.; ROY, A. 1986. Responses to CRH in the hypercortisolism of depression and Cushing's disease. N. Engl. J. Med. 314:1329-1335.

GONCHARUK, V.; VAN HEERIKHUIZE, J.; SWAAB, D.; BUIJS, R. 2002. Paraventricular nucleus of the human hypothalamus in primary hypertension: Activation of corticotropin-releasing-hormone neurons. J. Comp. Neurol. 443:321-331.

GRASSI, G. 1998. Role of the sympathetic nervous system in human hypertension. J. Hypertens. 16:1979-1987.

GURTU, S.; PANT, K.; SINHA, J.; BHARGAVA, C. 1984. An investigation into the mechanism of cardiovascular responses elicited by electrical stimulation of locus coeruleus and subcoeruleus in the cat. Brain Res. 301:59-64.

HASHIMOTO, K.; MAKINO, S.; HIRASAWA, R.; TAKAO, T.; SUGAWARA, M.; MURAKAMI, K.; ONO, K.; OTA, Z. 1989. Abnormalities in the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in spontaneously hypertensive rat during development of hypertension. Endocrinology 125:1161-1167.

HAWKINS, P.; STEYN, C.; McCARRIGLE, H.; CALDER, N.; SAITO, T.; STRATFORD, L.; NOAKES, D.; NOAKES, D. 2000a. Cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis development in late gestation fetal sheep and young lambs following modest maternal nutrient restriction in early gestation. Reprod. Fertil. Dev. 12:443-456.

HAWKINS, P.; STEYN, C.; OZAKI, T.; SAITO, T.; NOAKES, D.; 2000b. Effect of maternal undernutrition in early gestation on ovine fetal blood pressure and cardiovascular reflexes. Am. J. Physiol. 279:R340-R348.

HAWKINS, P.; HANSON, M.; MATTHEWS, S. 2001. Maternal undernutrition in early gestation alters molecular regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the ovine fetus. *J. Neuroendocrinol.* 13:855-861.

IWASE, M.; WADA, M.; WAKISAKA, M.; YOSHIZUMI, H.; YOSHINARI, M.; FUJISHIMA, M. 1995. Effects of maternal diabetes on blood pressure and glucose tolerance in offspring of spontaneously hypertensive rat: relation to birth weight. *Clin. Sci.* 89:255-260.

JANSSON, T.; LAMBERT, G. 1999. Effect of intrauterine growth restriction on blood pressure, glucose tolerance and sympathetic activity in the rat at 3-4 months of age. *J. Hypertens.* 17:1239-1248.

JARA, A.; GONZÁLEZ, G. 2001. Fisiología de la corteza suprarrenal. En: A. Jara Albarrán., editor. *Endocrinología*. Madrid España: Editorial Médica Panamericana. p:235-241.

KALIN, N.; SHELTON, S.; KRAEMER, G.; MCKINNEY, W. 1983. Corticotropin-releasing-factor administered intraventricularly to Rhesus monkey. *Peptides* 4:217-220.

KAWAMURA, H.; GUNN, C.; FROHLICH, E. 1978. Cardiovascular alteration by nucleus locus coeruleus in spontaneously hypertensive rat. *Brain Res.* 140:137-147.

KIM, Y.; DUDLEY, C. 1989. Re-evaluation of the effects of norepinephrine on the single-unit activity of paraventricular neurosecretory neurons. *Neurosci. Lett.* 97:103-110.

KU, I.; TAN, L.; LI, L.; DING, X. 1988. Role of corticotropin-releasing-factor and substance P in pressor responses of nuclei controlling emotions and stress. *Peptides* 19:677-682.

KUBO, T.; KIHARA, M.; HATA, H.; MISU, Y. 1987. Cardiovascular effects in rats of alpha 1 and alpha 2 adrenergic agents injected into the nucleus tractus solitarii. *Naunyn Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 335:274-277.

KRUKOFF, T.; MACTAVISH, D.; JHAMANDAS, J. 1999. Hypertensive rats exhibit heightened expression of corticotropin-releasing-factor in activated central neurons in response to restraint stress. *Mol. Brain Res.* 65:70-79.

LANGLEY-EVANS, S. 1997a. Hypertension induced by foetal exposure to a maternal low protein diet, in the rat, is prevented by pharmacological blockade of maternal glucocorticoid synthesis. *J. Hypertens.* 15:537-544.

LANGLEY-EVANS, S. 1997b. Intrauterine programming of hypertension by glucocorticoids. *Life Sci.* 60:1213-1221.

LANGLEY-EVANS, S.; JACKSON, A. 1994. Increased systolic blood pressure in adult rats induced by fetal exposure to maternal low protein. *Clin. Sci.* 86:217-222.

LANGLEY-EVANS, S.; GARDNER, D.; JACKSON, A. 1996a. Association of disproportionate growth of fetal rats in late gestation with raised systolic blood pressure in later life. *J. Reprod. Fertil.* 106:307-312.

LANGLEY-EVANS, S.; GARDNER, D.; JACKSON, A. 1996(b). Maternal protein restriction influences the programming of the rat hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Nutr.* 126:1578-1585.

LANGLEY-EVANS, S.; PHILLIPS, G.; BENEDICTSSON, R.; GARDNER, D.; JACKSON, A.; SECKL, J. 1996c. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta* 17:169-172.

LAMBERT, G. 2001. Paring down on descartes: A review of brain noradrenaline and sympathetic nervous system. *Clin. Ex. Pharmacol. Physiol.* 28:979-982.

LAW, C.; SHIELL, A. 1996. Is blood pressure inversely related to birth weight? The strength of evidence from a systematic review of the literature. *J. Hypertens.* 14:935-941.

LESAGE, J.; BLONDEAU, B.; GRINO, M.; BREANT, B. ; DUPOUY, J.P. 2001. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* 142:1692-1702.

LEVITT, N.; LINDSAY, R.; HOLMES, M.; SECKL, J. 1996. Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology* 64:412-418.

LINDSAY, R.; LINDSAY, R.; EDWARDS, C.; SECKL, J. 1996a. Inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in pregnant rat and the programming of blood pressure in the offspring. *Hypertension* 27:1200-1204.

LINDSAY, R.; LINDSAY, R.; WADDELL, B.; SECKL, J. 1996b. Programming of glucose tolerance in the rat: role of placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Diabetología* 39:1299-1305.

LÓPEZ-BERNAL, A.; FLINT, A.; ANDERSON, A.; TURNBULL, A. 1980. 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in human placenta and desidua. *J. Steroid. Biochem.* 13:1081-1087.

LUCAS, A. 1991. Programming by early nutrition in man. *Ciba Found Symp.* 156:38-50.

MANNING, J.; VEHASKARI, V. 2001. Low birth weight-associated adult hypertension in the rat. *Pediatr. Nephrol.* 16:417-422.

MASTORAKOS, G.; KAROUTSOU, E.; MIZAMTSIDI, M. 2006. Corticotropin releasing hormone and the immune/inflammatory response. *Eur. J. Endocrinol.* 155:77-84.

MCMILLEN, I.; ROBINSON, J. 2005. Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiol. Rev.* 85:571-633.

MERLET-BENICHO, C.; GILBERT, T.; MUFFAT-JOLY, M.; LALIEVRE, M.; LEROY, B. 1994. Intrauterine growth retardation leads to a permanent nephron deficits in the rat. *Pediatr. Nephrol.* 8:175-180.

MURPHY, B.; CLARCK, S.; DONALD, I.; PINSKY, M.; VEDADY, D. 1974. Conversion of maternal cortisol to cortisone during placental transfer to the human fetus. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 118:538-541.

NOVY, M.; WALSH, S. 1983. Dexamethasone and estradiol treatment in pregnant rhesus macaques: Effects on gestation length, maternal plasma hormones and fetal growth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 145:920-930.

NWAGWU, M.; COOK, A.; LANGLEY-EVANS, S. 2000. Evidence of progressive deterioration of renal function in rat exposed to a maternal low-protein diet in utero. *Br. J. Nutr.* 83:79-85.

NYIRENDA, M.; LINDSAY, R.; KENYON, C.; BURSHELL, A.; SECKL, J. 1998. Glucocorticoid exposure in late gestation permanently programmes rat hepatic phosphoenolpyruvat carboxykinase and glucocorticoid receptor expression and causes glucose intolerance in adult offspring. *J. Clin. Invest.* 101:2174-2181.

OLAUSSON, H.; UVNÄS-MOBERG, K.; SOHLSTRÖM, A. 2003. Postnatal oxytocin alleviates adverse effects in adult rat offspring caused by maternal malnutrition. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 284:E475-E480.

OSMOND, C.; BARKER, D.; WINTER, P.; FALL, C.; SIMMOND, S. 1993. Early growth and death from cardiovascular disease in women. *Br. Med. J.* 307:1519-1524.

PAGE, M.; ABERCROMBIE, E. 1999. Discrete local application of corticotropin-releasing factor increases locus coeruleus discharge and extracellular norepinephrine in rat hippocampus. *Synapse* 33:304-313.

PARKES, D.; RIVEST, S.; LEE, S.; RIVIER, C.; VALE, W. 1993. Corticotropin-releasing-factor activates c-fos, NGFI-B, and corticotropin-releasing-factor gene expression within the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Mol. Endocrinol.* 7:1357-1367.

PÉREZ, H.; RUIZ, S.; SOTO-MOYANO, R. 2002. Prenatal malnutrition-induced hipertensión in young rats is prevented by neonatal capsaicin treatment. *Neurosci. Let.* 328:253-256.

PÉREZ, H.; NUÑEZ, H.; RUIZ, S.; WHITE, A.; GOTTELAND, M. 2004. Hypertension induced by fetal exposure to maternal undernutrition increased plasmatic corticosterone and hypothalamic corticotropin-releasing-factor RNAm expression in the rat. *FENS Abstract.* 2, A148.19.

PÉREZ, H.; RUIZ, S.; NUÑEZ, H.; WHITE, A.; GOTTELAND, M.; HERNÁNDEZ, A. 2006. Paraventricular-coerulear interactions: Role in hypertension induced by prenatal undernutrition in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 24:1209-1219.

PERSSON, E.; JANSSON, T. 1992. Low birth weight is associated with elevated adult blood pressure in the chronically catheterized guinea-pig. *Acta Physiol. Scand.* 145:195-197.

PHILLIPS, D.; BARKER, D.; HALES, C.; HIRST, S.; OSMOND, C. 1994. Thinness at birth and insulin resistance in adult life. *Diabetología* 37:150-154.

PHILLIPS, D.; BARKER, D.; FALL, C.; SECKL, J.; WHORWOOD, C.; WOOD, P.; WALKER, B. 1998. Elevated plasma cortisol concentrations: a link between low birth weight and the insulin resistance syndrome? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:757-760.

PHILLIPS, D.; WALKER, B.; REYNOLDS, R.; FLANAGAN, D.; WOOD, P.; OSMOND, C.; BARKER, D.; WHORWOOD, C. 2000. Low birth weight predicts elevated plasma cortisol concentrations in adults from 3 populations. *Hypertension* 35:1301-1306.

QUALY, J.; WESTFALL, T. 1993. Age-dependent overflow of endogenous norepinephrine from paraventricular hypothalamic nucleus of hypertensive rats. *Am. J. Physiol.* 265:H39-H46.

RASSNICK, S.; HOFFMAN, G.; RABIN, B.; SVED, A. 1998. Injection of corticotropin-releasing-hormone into the locus coeruleus or foot shock increases neuronal Fos expression. *Neuroscience* 85:259-268.

REINCKE, M.; ALLOLIO, B.; WÜRTH, G.; WINKELMANN, W. 1993. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in critical illness: Response to dexamethasone and corticotropin releasing hormone. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77:151-156.

ROSENE, D.; LISTER, J.; SCHWAGERL, A.; TONKISS, J.; McCORMICK, C.; GALLER, J. 2004. Prenatal protein malnutrition in rats alters the c-Fos response of neurons in the anterior cingulate and medial prefrontal region to behavioral stress. *Nutr. Neurosci.* 7:281-289.

SAPHIER, D. 1989. Catecholaminergic projections to tuberoinfundibular neurones of the paraventricular nucleus. I Effects of stimulation of A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, A<sub>6</sub> and C<sub>2</sub> cell groups. *Brain Res. Bull.* 23:389-395.

SAPHIER, D. 1993. Electrophysiology and neuropharmacology of noradrenergic projections to rat PVN magnocellular neurons. *Am. J. Physiol.* 264:R891-R902.

SAUNDERS, W.; THORNWILL, J. 1986. Pressure tachycardic and behavioral excitatory responses in conscious rat following isv administration of ACTH and CRF are blocked by naloxone pretreatment. *Peptides* 7:597-601.

SAWCHENKO, B.; SWANSON, L. 1995. The organization of noradrenergic pathways from the brain stem to the paraventricular and supraoptic nuclei in locus coeruleus-induced baroreflex suppression in rats. *Am. J. Physiol.* 269:446-452.

SCHULZ, C.; LEHNER, H. 1996. Activation of noradrenergic neurons in the locus coeruleus by corticotropin-releasing- factor. A microdialysis study. *Neuroendocrinology* 63:454-458.

SECKL, J. 1994. Glucocorticoids and small babies. *Q. J. Med.* 87:259-262.

SECKL, J. 1998. Physiologic programming of the fetus. *Clin. Perinatol.* 25:939-964.

SECKL, J.; CLEASBY, M.; NYIRENDA, M. 2000. Glucocorticoids, 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase and fetal programming. *Kidney International* 57:1412-1417.

SECKL, J.; WALKER, V. 2001. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1: a tissue-specific amplifier of glucocorticoid action. *Endocrinology* 142:1371-1376.

SHERMAN, R.; LANGLEY-EVANS, S. 2000. Antihypertensive treatment in early postnatal life modulates prenatal dietary influences upon blood pressure in the rat. *Clin. Sci.* 98:269-275.

SHOEMAKER, W.; WURTMAN, R. 1971. Perinatal undernutrition: accumulation of catecholamines in rat brain. *Science* 171:1017-1019.

SOHLSTROM, A.; CARLSSON, C.; UVNAS-MOBERG, K. 2000. Effects of oxytocin treatment in early life on body weight and corticosterone in adult offspring from ad libitum-fed and food-restricted rats. *Biol. Neonate* 78:33-40.

SOTO-MOYANO, R.; BELMAR, J.; PÉREZ, H.; RUIZ, S.; HERNÁNDEZ, A. 1995. Central noradrenergic hyperactivity early in life: A hypothesis on the origin of morpho-functional brain disorders induced by malnutrition. *Biol. Res.* 28:105-111.

STEWART, P.; ROGERSON, F.; MASON, J. 1995a. Type 2 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase messenger RNA and activity in human placenta and fetal membranes: its relationship to birth weight and putative role in fetal steroidogenesis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80:885-890.

STEWART, P.; WHORWOOD, C.; MASON, J. 1995b. Type 2 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase in fetal and adult life. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 55:465-471.

SWANSON, L.; SAWCHENKO, P.; LIND, R.; RHO, J. 1987. The CRH motoneuron: differential peptide regulation in neurons with possible synaptic, paracrine, and endocrine outputs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 512:12-23.

TONOLO, G.; FRASER, R.; CONELL, J.; KENYON, C. 1988. Chronic low-dose infusions of dexamethasone in rats: Effect on blood pressure, body weight and plasma atrial natriuretic peptide. *J. Hypertension* 6:25-31.

VALENTINO, R.; FOOTES, S. 1988. Corticotropin-releasing-hormone increases tonic but not sensory-evoked activity of noradrenergic locus coeruleus neurons in unanesthetized rats. *J. Neurosci.* 8:1016-1025.

VALENTINO, R.; PAGE, M.; VAN BOCKSTAELE, E.; ASTON-JONES, G. 1992. Corticotropin-releasing-factor innervation of the locus coeruleus regions: distribution of fibers and sources of input. *Neuroscience* 48:689-705.

VEHASKARI, V.; AVILES, D.; MANNING, J. 2001. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int.* 59:238-245.

WELBERG, L.; SECKL, J.; HOLMES, M. 2001. Prenatal glucocorticoid programming of brain corticosteroid receptors and corticotrophin-releasing hormone: possible implications for behaviour. *Neuroscience* 104:71-79.

WHITE, P.; MUNE, T.; ROGERSON, F.; KAYES, K. 1997. 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase and its role in the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Pediatr. Res.* 41:25-29.

WHORWOOD, C.; STEWARD, P. 1996. Human hypertension caused by mutations in the 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase gene: a molecular analysis of apparent mineralocorticoid excess. *J. Hypertension* 15:S19-S24.

WINTOUR, E.; MORITZ, K.; JOHNSON, K.; RICARDO, S.; SAMULE, C.; DODIC, M. 2003. Reduced nephron number in adult sheep, hypertensive as a result of prenatal glucocorticoid treatment. *J. Physiol.* 549:929-935.

WOODALL, S.; JOHNSTON, B.; BREIER, D.; GLUCKMAN, P. 1996. Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure. *Pediatr. Res.* 40:438-443.

WOODS, L.; WEEKS, D.; RASH, R. 2004. Programming of adult blood pressure by maternal protein restriction: Role of nephrogenesis. *Kidney Int.* 65:1339-1348.

YANG, S.; ZHANG, L. 2004. Glucocorticoids and vascular reactivity. *Curr. Vasc. Pharmacol.* 2:1-12.