

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**EFFECTO DEL ESTRÉS GESTACIONAL SOBRE LOS CAMBIOS
EN LOS RECEPTORES β -ADRENÉRGICOS CARDÍACOS
DURANTE EL DESARROLLO DE RATAS HEMBRAS Y SUS
CONSECUENCIAS A NIVEL CARDIOVASCULAR Y
METABÓLICO**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado
académico de Doctora en Farmacología

Por

BEATRIZ GABRIELA PIQUER FRANCO

Director de Tesis

Dr. Hernán Lara Peñaloza

Santiago – Chile

2016

Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo al Laboratorio de Neurobioquímica, a todos los estudiantes que han pasado, al Dr. Alfonso Paredes por su gran apoyo y paciencia en estos siete años de estadía y en especial a la Dra. Monika Greiner con quien pasamos del susto a cacarear sin parar, muchas gracias por enseñarme muchísimas cosas extrañas lo que nos hace ser más nerds que nunca.

Muchas gracias a todos los que conforman el bioterio, a la Dra. Fernanda Schäufler, Freddy Ruz y Elsa Carrasco, gracias a su enorme cuidado y dedicación con los animales, hicieron que pudiera contar con ustedes, liberándome muchos fines de semana y días de trabajo.

Quiero agradecer profundamente a mi tutor el Dr. Hernán Lara, quien me recibió como alumna de pregrado sin experiencia en trabajo de laboratorio y quien me guió con mucha dedicación en estos años, ayudándome a aprender y a terminar formando la profesional que soy ahora.

Tengo que agradecer a mis papás por estar siempre presentes y por presionarme infinitamente a ser más y mejor, desde que entré a bachillerato hace muchos años hasta hoy. Gracias por insistir cuando no quería nada más y por seguir insistiendo cuando mi camino se desviaba. Gracias por creer que era capaz de llegar adonde estoy y por darme todas las oportunidades para que así fuera. Y gracias por todo lo que sé que seguirán haciendo.

Finalmente, quiero agradecer a mi marido Jorge Araya, quien llegó a mi vida hace más de una década y se transformó en mi mayor apoyo. Muchas gracias por aguantarme los días en que los experimentos no salían, por compartir mi felicidad en los días en que los experimentos sí resultaban, por creer en mí y simplemente por estar conmigo el día a día en esta gran montaña rusa que fue el doctorado y que seguirá siendo nuestra vida.

Financiamiento

Esta memoria fue financiada por:

- Proyecto FONDECYT N° 1130049. Investigador Responsable: Dr. Hernán Lara
- Beca de apoyo a la realización de tesis doctoral CONICYT N° 21120077. Becario: Beatriz Piquer

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

Presentaciones a congresos

Los resultados de esta tesis han sido presentados en los siguientes congresos científicos:

- Presentación oral “Cambios en los receptores β -adrenérgicos cardíacos en la progenie de madres expuestas a estrés durante la gestación” en el simposio de estudiantes de Doctorado en Farmacología realizado en el XXXV Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Valdivia, Chile, 27-30 de Noviembre 2013

- Presentación oral “La exposición crónica de la madre gestante a estrés simpático reprograma el desarrollo fetal y la respuesta a una sobrecarga simpática de la descendencia.” XXXVI Congreso Anual de la Sociedad de Farmacología de Chile, Termas de Chillán, Chile, 5-7 de Noviembre 2014

- Poster “El estrés simpático aplicado durante la gestación en ratas modifica el transportador placentario de noradrenalina. Cambios dependientes de género.” Piquer B, Fonseca J.L, Lara H.E. XXVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción, Antofagasta, Chile, 4-7 de Septiembre 2015

- Presentación panel electrónico oral “El estrés simpático gestacional disminuye el transporte placentar de noradrenalina y deteriora la fertilidad de la descendencia.” Piquer B., Fonseca J.L., Lara H.E. Seminario DOHaD Chile 2016: Origen temprano de las enfermedades crónicas. Nutrición y medio ambiente materno: una oportunidad para la intervención, Santiago, Chile, 29-30 de Junio 2016

Publicaciones

Parte de los resultados de esta tesis han dado origen a un artículo científico aceptado en la revista *Reproduction, The Journal of the Society for Reproduction and Fertility* en el año 2016.

“Gestational stress, placental norepinephrine transporter and offspring fertility”
Beatriz Piquer, Jose L Fonseca, Hernán E. Lara

Doi: 10.1530/REP-16-0312

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	ix
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ABREVIACIONES.....	xii
RESUMEN	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN	1
Situaciones de estrés durante la gestación y programación fetal.....	2
Programación fetal por estrés mediante activación del SNS	4
Estrés y receptores β -adrenérgicos cardíacos.....	5
Estrés y disfunción placentaria	7
Hipótesis.....	9
Objetivo general	10
Objetivos específicos	10
MATERIALES Y MÉTODOS	11
• Animales.....	11
• Obtención de las muestras	11
- 15 y 19 días de gestación.....	11
- 4 días postnatales.....	12
- 20 y 60 días postnatales.....	12
• Homogenización de tejido.....	12
- Determinación de receptores β -adrenérgicos.....	12
a) Preparación de la fracción cruda de membranas:	12
b) Determinación de receptores β -adrenérgicos	13
- Determinación de Noradrenalina por HPLC	13
a) En corazón	13

b) En plasma	14
• Determinación de glucosa plasmática	14
• Determinación de corticosterona e insulina plasmática por kit de ELISA.....	14
• Determinación del índice HOMA.....	15
• Determinación de la expresión génica de los NET placentarios y los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos cardíacos a través de PCR en tiempo real.....	15
• Determinación de las proteínas de los NET placentarios y los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos cardíacos por western blot.....	17
a) Extracción y cuantificación de proteínas	17
b) Electroforesis y Western Blot.....	17
• Determinación de $^3\text{H-NE}$ incorporación por los NET placentarios	18
• Sobrecarga adrenérgica crónica mediante administración de Isoproterenol...	19
• Determinación de área y perímetro de los cardiomiocitos	19
• Análisis Estadístico	19
RESULTADOS.....	20
1) Etapa prenatal	20
Objetivo específico 1	20
A) Efecto de la preñez y del estrés crónico durante la gestación sobre las concentraciones de NA plasmática	20
B) Efecto de la preñez y del estrés crónico durante la gestación sobre los niveles de corticosterona plasmática	21
C) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre el número, el peso de las crías y sus placentas	22
D) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los NET placentarios	24
2) Etapa postnatal.....	26
Objetivo específico 2.....	26

A) Efecto del estrés crónico durante la gestación, sobre la alimentación y la ganancia de peso en ratas gestantes controles y estrés.....	26
B) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los días de gestación, número de crías totales, número de crías separadas por género, pesos de las crías hembras y sus corazones en etapa prenatal y postnatal	27
C) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los niveles de noradrenalina plasmática y cardíaca en crías hembras	29
a) Noradrenalina plasmática.....	29
b) Noradrenalina cardíaca	30
D) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los niveles de receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos en corazones de ratas hembras.....	31
a) Receptores β_1 -adrenérgicos	33
b) Receptores β_2 -adrenérgicos	36
c) Razón receptores β_1/β_2 -adrenérgicos.....	38
Objetivo específico 3.....	39
E) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre la respuesta cardíaca frente a una sobrecarga adrenérgica crónica en ratas hembras.....	39
F) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los cardiomiocitos frente a una sobrecarga adrenérgica crónica en ratas hembras	43
Objetivo específico 4.....	47
G) Efecto del estrés durante la gestación sobre la respuesta glicémica e insulínica frente a una sobrecarga de glucosa en las crías hembras adultas.	47
a) Concentración de glucosa.....	47
c) Índice HOMA	49
DISCUSIÓN	50
a) Etapa prenatal	50
Efectos de la preñez y del estrés crónico durante la gestación sobre las concentraciones de NA y de corticosterona plasmática	50

Efectos del estrés crónico durante la gestación sobre el número, el peso de las crías y sus placentas	52
Efectos del estrés crónico gestacional por frío sobre los NET placentarios.....	53
Efectos del estrés crónico gestacional por frío en la etapa prenatal	54
b) Etapa postnatal.....	55
Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre la alimentación y la ganancia de peso en ratas gestantes controles y estrés.....	56
Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los días de gestación, número de crías totales, número de crías separadas por género, pesos de las crías hembras y sus corazones.....	56
Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los niveles de noradrenalina plasmática y cardíaca en crías hembras.....	57
Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los niveles de receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos en corazones de ratas hembras.....	58
Receptores β_1 -adrenérgicos	59
Receptores β_2 -adrenérgicos	60
Razón receptores β_1 -adrenérgicos/ β_2 -adrenérgicos	61
Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre la respuesta cardíaca y los cardiomiocitos frente a una sobrecarga adrenérgica crónica en ratas hembras.....	62
Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre la respuesta glicémica e insulínica frente a una sobrecarga de glucosa	65
CONCLUSIÓN	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Concentración de NA plasmática en ratas.....	20
Figura 2: Concentración de corticosterona plasmática en ratas.....	21
Figura 3: Peso de las crías y de sus placentas a los 15 días de gestación.	23
Figura 4: Peso de las crías y de sus placentas a los 19 días de gestación.	23
Figura 5: Incorporación de 3H-NA y ARN mensajero de NET en placentas de 15 y 19 días de gestación.....	25
Figura 6: Cuantificación de proteínas de NET mediante western blot en placentas de crías controles y estrés de 15 y 19 días de gestación	25
Figura 7: Peso diario de las ratas preñadas y de lo que comen durante el periodo de gestación.	26
Figura 8: Peso de las crías hembras y de sus corazones a distintas edades.....	28
Figura 9: Concentración de NA plasmática de crías hembras.	29
Figura 10: Concentración de NA en corazones de crías hembras.....	30
Figura 11: Porcentaje de unión total, afinidad y concentración de receptores β -adrenérgicos en membranas cardíacas de ratas hembras.....	32
Figura 12: Receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos en corazones de crías hembras controles.....	34
Figura 13: Receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos en corazones de crías hembras controles y estrés.....	35
Figura 14: Receptores β_2 -adrenérgicos cardíacos en corazones de crías hembras a través de qPCR.....	36
Figura 15: Receptores β_2 -adrenérgicos cardíacos en corazones de crías hembras a través de <i>western blot</i>	37
Figura 16: Razón receptores β_1/β_2 -adrenérgicos en los corazones de las crías hembras controles y estrés de 20 y 60 días.....	38
Figura 17: Registro de la PA y de los BPM en una rata hembra control sin inyecciones de ISO.	40

Figura 18: Registro de la PA y de los BPM en una rata hembra control luego de la administración de ISO.....	40
Figura 19: Registro de la PA en una rata hembra estrés.....	41
Figura 20: Registro de la PA y de los BPM durante la muerte de una rata hembra estrés luego de la primera administración de ISO.	41
Figura 21: Porcentaje de supervivencia de las crías hembras.	42
Figura 22: Fotos representativas de cortes de corazón teñidos con hematoxilina-eosina.	43
Figura 23: Área y perímetro de cardiomiocitos de crías hembras controles, estrés, control ISO y estrés ISO.	44
Figura 24: Fotos representativas de cortes de corazón teñidos con tricromo-masson..	45
Figura 25: Cuantificación del porcentaje de colágeno en corazones de crías hembras controles, estrés, control ISO y estrés ISO.	46
Figura 26: Concentración de glucosa en sangre luego de una sobrecarga de glucosa en crías hembras controles y estrés.....	47
Figura 27: Concentración de insulina en sangre luego de una sobrecarga de glucosa en crías hembras controles y estrés.....	48
Figura 28: Índice HOMA en crías hembras controles y estrés.	49
Figura 29: Modelo del efecto de la activación del SNS materno a través del protocolo de estrés por frío sobre las crías hembras.	66

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Condiciones de la reacción de PCR para cada uno de los genes determinados	16
Tabla 2: Secuencias de los partidores utilizados para cada gen de interés	16
Tabla 3: Detalle de los anticuerpos utilizados	18
Tabla 4: Comparación en el número de crías y el número de crías separadas por género entre animales que fueron estresados durante la gestación y controles.	22
Tabla 5: Comparación en los días de gestación, el número de crías y el número de crías separadas por género entre animales que fueron estresados durante la gestación y controles.	27

ABREVIACIONES

³H-DHA: dihidroalprenolol tritiado

A: adrenalina

ACTH: hormona adrenocorticotropa

BPM: latidos por minuto

cpm: cuentas por minuto

DHA: dihidroalprenolol

dpm: desintegraciones por minuto

IC50: concentración capaz de producir el 50% de desplazamiento

ISO: Isoproterenol

NA: noradrenalina

NET: Transportador de noradrenalina

PA: presión arterial

SNS: sistema nervioso simpático

RESUMEN

El estrés está definido como cualquier estímulo capaz de alterar la homeostasis del organismo, es una reacción fisiológica necesaria para la supervivencia y es la forma que posee el organismo para afrontar una situación agobiante y/o amenazadora. Frente a una situación de estrés, el organismo reacciona generando una respuesta simpaticomimética conocida como “respuesta de pelea o huida”, produciendo un aumento en la liberación de noradrenalina.

Todos los organismos vivos son moldeables durante el embarazo y sus primeros momentos de vida. Esto les permite adaptarse al medio ambiente que los rodea sin regirse exclusivamente por su carga genética. El periodo de gestación es una etapa particularmente sensible a situaciones de estrés, pudiéndose generar modificaciones en el ambiente fetal lo que a su vez puede producir una adaptación permanente en el desarrollo postnatal, proceso conocido como programación fetal.

Se han encontrado estrechas relaciones entre diversas enfermedades y el ambiente fetal, entre ellas encontramos relaciones entre bajo peso al nacer con un aumento en las muertes por enfermedades coronarias, intolerancia a la insulina y aumento en la presión arterial en la adultez.

Nuestro objetivo fue determinar el efecto producido por tratamientos de estrés por frío crónico (4°C/3h/día) aplicado durante todo el periodo de gestación en ratas Sprague-Dawley sobre los transportadores de noradrenalina placentarios, los receptores β -adrenérgicos cardíacos y los cambios sobre la función cardiovascular y metabólica en la descendencia hembra.

Se observó que el tratamiento de estrés por frío crónico generó un aumento en las concentraciones de noradrenalina y corticosterona en el plasma de las ratas gestantes junto con una disminución en la funcionalidad de los transportadores de noradrenalina placentarios. No se observaron cambios en el peso de las ratas gestantes, sin embargo se encontró un aumento en el peso de las crías estresadas durante la etapa prenatal. Además, se observó que en crías hembras de 20 días se generó un aumento en la razón de los receptores β_1/β_2 -adrenérgicos cardíacos y que a los 60 días se registra una disminución en la afinidad de estos receptores y un aumento en las áreas y perímetros de los cardiomiocitos junto con un aumento en el peso de sus corazones.

Con el objetivo de determinar si el aumento en área y perímetro de los cardiomiocitos afecta la funcionalidad del corazón se sometió a las crías hembras adultas a una sobrecarga adrenérgica crónica (administración de isoproterenol subcutáneo, 125 µg/kg de peso/10 días), encontrándose un aumento en la presencia de extrasístoles lo que generó un 40% de mortalidad en las crías hembras. Finalmente, para determinar los posibles efectos metabólicos del estrés prenatal se realizó un test de tolerancia a la glucosa (administración oral de 2 g de glucosa/kg de peso de una solución al 40%) encontrando resistencia a la insulina en las crías hembras adultas.

Tomando en cuenta todo lo anteriormente mencionado, concluimos que la exposición a una situación crónica de estrés por frío durante el periodo de gestación produjo un aumento en las concentraciones de noradrenalina plasmática materna junto con una disminución en la funcionalidad de los transportadores de noradrenalina placentarios. Esto programaría a estos nuevos sujetos, causando una mayor sensibilidad frente a una sobrecarga adrenérgica crónica (40% muerte) junto con presencia de resistencia a la insulina en las crías hembras adultas.

ABSTRACT

Stress is defined as any stimulus capable of altering the homeostasis of the organism, it is a physiological reaction necessary for survival and is the way that has the organism to face a threatening and/or overwhelming situation. Faced with a stressful situation, the organism reacts by generating a sympathomimetic response known as the “fight or flight response”, resulting in an increase in norepinephrine release.

All living organisms are moldable during pregnancy and their first moments of life. This allows them to adapt to the environment around them not bound exclusively to their genetic charge. The gestation period is particularly sensitive to a stress situation capable of modifying the fetal environment, which can cause a permanent adaptation on the postnatal development; this is known as fetal programming.

Close relationships between various diseases and fetal environment has been found. Among them there are relations between low birth weight with an increase in deaths from coronary diseases, insulin intolerance and increase in blood pressure in adulthood.

Our objective was to determine the effect produced by chronic cold stress treatments (4°C/3h/day) applied during the entire period of pregnancy in Sprague-Dawley rats on placental norepinephrine transporters, cardiac β -adrenergic receptors and changes on cardiovascular and metabolic function in the female offspring.

An increase in norepinephrine and corticosterone concentrations on plasma of stressed pregnant rats with a decrease in the functionality of placental norepinephrine transporters was observed. No changes were observed in the weight of pregnant rats, however an increase in the weight of pups was found prenatally. In addition, females of 20 days old of the stressed progeny, presented an increase in the ratio of the cardiac β_1/β_2 -adrenergic receptors, and at 60 days old, a decrease in the affinity of these receptors was apparent. An increase in the cardiac cells areas and perimeters along with an increase in the weight of their hearts was also found at 60 days old.

To determine what was happening with the functionality of these hearts, we exposed the adult females to a chronic adrenergic overload (administration of a daily subcutaneous isoproterenol injection with 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of weight/10 days). The chronic

overload of adrenergic stimulation provoked an increase in the presence of premature beats causing death to 40% of the females pups. To determine possible programming of metabolic effects of prenatal stress, a tolerance glucose test (oral administration of 2g of glucose/kg of weight of a 40% solution) was performed. Results demonstrated that gestational stress programmed a metabolic disturbance that was expressed in the adult progeny, founding insulin resistance in adult females.

Therefore, the increase in maternal plasma norepinephrine concentration provoked by the exposure to chronic cold stress during all gestation period caused a decrease in the functionality of the placental norepinephrine transporters. This would be the cause to program the fetus for an increased sensitivity to a chronic adrenergic overload (40% of death) together with the presence of insulin resistance in adult females.

INTRODUCCIÓN

El estrés, vías de respuestas y sus consecuencias

El estrés se ha transformado en una situación cotidiana que afecta a todos los seres humanos. Esto seguirá en aumento puesto que las sociedades se han ido volviendo cada vez más exigentes caracterizándose por una competencia constante entre las personas, lo que produce un nivel de estrés que aumenta diariamente [1]. Dado que el estrés es una perturbación del funcionamiento normal del organismo, cuando éste se hace crónico se traduce en un aumento en diversas enfermedades, las que principalmente se caracterizan por la disfunción de los órganos que se relacionan directamente con el estrés, tales como enfermedades mentales, psicosomáticas, infecciosas, cardiovasculares, autoinmunes, entre otras [2]. La mayoría de estas enfermedades se caracterizan por cambios en la respuesta neuronal de los órganos blancos sin que al momento se conozcan los mecanismos por los cuales se producen los efectos.

El estrés está definido como cualquier estímulo capaz de alterar la homeostasis del organismo, es una reacción fisiológica necesaria para la supervivencia y es la forma que posee el organismo para afrontar una situación agobiante y/o amenazadora. Una situación de estrés puede activar diversas vías: el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal la cual produce liberación de ACTH; el sistema hormonal adrenomedular con la concomitante liberación de adrenalina (A) y/o la activación del Sistema Nervioso Simpático (SNS), lo que produce liberación de noradrenalina (NA). Las dos primeras vías se activan generalmente frente a situaciones de miedo paralizante y pasivo o bien frente a una situación de amenaza metabólica, como sería en caso de hipoglicemia, hemorragia, asfixia, entre otros. En cambio, la activación del SNS, la cual produce liberación de NA, se observa en situaciones de redistribución de sangre o en situaciones de “pelea o huida”, como sería en el caso de una situación de frío sin hipotermia [3-5].

En la literatura existen diversos trabajos que asocian tratamientos de estrés con la activación de las vías antes mencionadas. En el trabajo realizado por Gordon et al ratas hembras Sprague-Dawley fueron sometidas a un protocolo de estrés de “ejercicio de rotación” a 7 rpm, la cual es la velocidad máxima en la cual las ratas pueden

mantenerse corriendo sin caerse, o bien mediante un protocolo de estrés por frío manteniéndolas durante 6 horas a 3°C. En ambos casos se observó un aumento en la síntesis tanto de NA como de A en las ratas sometidas a estrés [6]. Por otro lado, Benedict et al, estudiaron el efecto del estrés agudo (nado en agua a 10°C/1 min/5 veces) como el estrés por frío crónico (6 horas/día/4 días a 4°C) en la liberación de NA en ratas macho Sprague-Dawley [7], encontrando que en ambos casos ocurre un aumento en la concentración de NA causado tanto por un aumento en su liberación como por un aumento en su síntesis debido a la activación del SNS mediado por el estrés sufrido por las ratas, este aumento en la concentración de catecolaminas tiene como consecuencias diversas alteraciones metabólicas y neuroendocrinas.

Situaciones de estrés durante la gestación y programación fetal

Todos los organismos vivos son moldeables en sus primeros momentos de vida y durante la gestación. Esto les permite adaptarse al medio ambiente que los rodea sin regirse exclusivamente por su carga genética. Existen ciertos periodos denominados críticos, en los cuales el feto puede verse mayormente afectado por cambios o situaciones externas. Es debido a todo esto que se ha acuñado el término de “programación fetal”, a través de este concepto se describe el proceso en el cual ciertos estímulos, que ocurren durante el periodo crítico del desarrollo fetal, tienen efectos duraderos y de por vida, pudiendo afectar el desarrollo de órganos, la fisiología y el metabolismo del organismo [8].

La programación fetal es una adaptación importante que les permite cambiar en una sola generación, mientras que la adaptación genética en respuesta a los cambios ambientales es más lenta. En términos de evolución, esta capacidad de adaptación que presentan los fetos durante el desarrollo, les permite adaptar sus necesidades metabólicas a las condiciones placentarias, lo que se vuelve una gran ventaja cuando estas condiciones siguen presentes en el medio postnatal. Sin embargo, cuando estas condiciones ya no están presentes en el medio luego del nacimiento, esta capacidad adaptativa se puede volver dañina puesto que puede generar una predisposición a padecer ciertas enfermedades, tales como enfermedades cardiovasculares, metabólicas y endocrinas [8-11]. Por ejemplo, se ha encontrado una relación entre las personas que tuvieron bajo peso al nacer, con un alto grado de padecer enfermedades

coronarias, hipertensión arterial, altas concentraciones de colesterol y metabolismos anormales de glucosa e insulina. Debido a que estas relaciones son independientes a la duración de la gestación, se sugiere que las enfermedades cardiovasculares tienen una relación estrecha con el ambiente fetal durante su desarrollo [11].

Existen diversas situaciones de estrés gestacional que pueden causar una programación fetal. Por ejemplo, se han realizado estudios de cohortes retrospectivos en seres humanos, estudios en animales pequeños (ratas, ratones, hámster) y/o en especies más grandes (ovejas y cerdos) los cuales demostraron la programación fetal a través de cambios nutricionales [12]. Se ha propuesto que las variaciones en el suministro nutricional durante el desarrollo fetal sería el principal estímulo de programación que determinaría riesgos de enfermedades en la vida adulta [12]. Por otro lado, Singh R et al, inyectaron intraperitonealmente corticosterona en concentraciones fisiológicas a ratas Sprague-Dawley preñadas (dos veces/día en E14 y E15) y encontraron que este corto periodo de exposición a elevadas concentraciones de corticosterona produjo una disminución en el número de nefrones junto con un aumento en la presión arterial en las crías. Esto demuestra que el estrés materno, el cual genera la misma concentración de corticosterona que la utilizada en este estudio, estaría produciendo programación fetal al igual que el desbalance nutricional [13].

Además de que la programación fetal puede ocurrir debido a diversos estímulos durante la gestación, estudios muestran que su intensidad depende del periodo en el que ocurren las situaciones de estrés. Uno de los estudios que llegó a esta conclusión se realizó sometiendo a ratas Wistar preñadas a un estrés crónico por frío (nado forzado/10 min/2 veces/día a 4°C) en distintos momentos de la gestación: en la primera mitad (E1-11), la segunda mitad (E12-21) y durante toda la preñez (E1-21) determinándose que el estrés en el primer periodo de gestación (E1-11) es más dañino para las crías, produciendo ratas con menor peso, menor tamaño y obteniendo más muertes postnatales que en las otras camadas [14].

El efecto producido a través de una programación fetal depende del tipo de estrés recibido, del periodo gestacional en el cual ocurrió y del organismo sobre el cual ocurre, encontrando diferencias entre crías hembras y machos. Por ejemplo, en un estudio realizado a partir de un modelo de programación fetal a través de desnutrición materna en ratas, se encontró que solo las crías machos presentaron hipertensión

arterial, sin embargo si el protocolo de estrés es a través de un aumento de grasa en la dieta de la madre gestante esto causa disfunción endotelial en ambos géneros pero con hipertensión arterial exclusivamente en las crías hembras [15-16]. Otro estudio realizado en ratas Sprague-Dawley preñadas, a las cuales se les realizó un régimen de estrés por calor, luz e inmovilización (30 min/3 veces/día) entre los días 15 y 21 de gestación, se observó que en condiciones basales, las ratas estrés no tenían diferencias con las ratas control, pero luego de ser estresadas se observaba que las ratas estrés presentaban un aumento en la presión arterial durante la exposición al estrés mayor que el grupo control y que el ritmo cardíaco permanece elevado por más tiempo luego de terminado. Junto con eso, se encontró que las ratas hembras presentaron una respuesta cardiovascular mayor y más prolongada después de terminado el estrés respecto a los machos [17].

Programación fetal por estrés mediante activación del SNS

Nuestro laboratorio trabaja con un protocolo de estrés por frío crónico intermitente (4°C/3 horas/día) aplicado durante todo el periodo de gestación en ratas Sprague-Dawley, lo cual causa una sobrecarga adrenérgica crónica lo cual afecta el desarrollo de los fetos sin producir cambios en los niveles de hormona adrenocorticotropa (ACTH) [4-5, 18-19]. En trabajos previos del laboratorio, se encontraron cambios en el desarrollo folicular incluyendo hipertrofia de las células de la teca y una prematura luteinización de los folículos asociados a una activación del SNS, algo que se ha visto en mujeres con el síndrome de ovario poliquístico [19], además se ha observado un aumento en la ingesta de alimento de estos animales, sin cambios en el peso corporal, presencia de resistencia a la insulina específica del ovario [20] junto con una modificación del desarrollo folicular temprano (retraso en la apertura vaginal, menor reclutamiento de folículos, menor número de ciclos estrales) [21]. Junto con esto, se encontró que la exposición crónica *in vivo* de ratas hembras adultas a una estimulación β -adrenérgica a través de la administración subcutánea de isoproterenol (ISO), produce una condición de ovario poliquístico (aumento de quistes, hipertecosis, disminución del número de folículos) [22], al igual que la provocada por protocolos de estrés por frío crónico intermitente aplicado durante todo el periodo gestacional.

Además, en nuestro laboratorio también se han observado diferencias en la respuesta frente a una situación de estrés dependiendo del género. Por ejemplo, al analizar el efecto del protocolo de estrés por frío crónico durante la gestación sobre las crías hembras adultas se observó un aumento en el tamaño ventricular (posible hipertrofia), una mayor concentración de receptores β -adrenérgicos cardíacos y un menor recambio de NA a nivel cardíaco que en machos. Esto indicaría que, frente a una situación de estrés, las hembras producirían una liberación mayor de NA, lo cual actuaría activando los receptores β -adrenérgicos en mayor medida que en los machos, motivo por el cual las hembras serían más propensas a padecer enfermedades cardiovasculares causadas por esta situación de estrés gestacional [23].

Estrés y receptores β -adrenérgicos cardíacos

Frente a una situación de estrés, el organismo responde activando al SNS, lo que produce un aumento en la liberación de NA, la cual a su vez activa los receptores adrenérgicos produciendo una respuesta simpaticomimética, conocida también como “respuesta de pelea o huida”. Esta respuesta produce efectos tales como aumentar el *output* cardíaco (ionotropismo y cronotropismo), dilatación de la pupila, aumento de la lipólisis en adipocitos, gluconeogénesis en hígado, entre otros. Entre los receptores activados por la liberación de NA están los receptores β -adrenérgicos. El receptor β_1 -adrenérgico se encuentra mayoritariamente en el corazón en donde su activación tiene efectos inótrpos y cronótrpos positivos. El receptor β_2 se encuentra predominantemente en musculatura lisa en donde produce relajación. Finalmente, el receptor β_3 produce efectos metabólicos tales como la lipólisis del tejido adiposo.

Se sabe que en el corazón de las ratas existen dos subtipos de receptores β -adrenérgicos: β_1 y β_2 , los cuales se encuentran en concentraciones similares en el nodo aurículo-ventricular [24]. Estudios en los receptores β -adrenérgicos en el corazón de ratas machos Sprague-Dawley adultas, mostraron que los cardiomiocitos ventriculares purificados presentaban solo receptores β_1 -adrenérgicos y que en cambio, en las células no musculares se encontraban los receptores β_2 -adrenérgicos [25].

En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que el protocolo de estrés a través de una activación simpática prenatal en ratas produce una disminución en la afinidad de los receptores β -adrenérgicos cardíacos en las crías machos adultas sin

cambios en sus concentraciones [23], lo que estaría indicando una disminución en la capacidad de la respuesta contráctil en los corazones de ratas estresadas comparadas con las controles. Estos cambios encontrados en la afinidad, tienen un significado funcional similar a los encontrados en humanos con fallas cardíacas en donde se observan alteraciones en la población de receptores β -adrenérgicos en el miocardio ventricular, causando una disminución en la concentración de receptores β_1 -adrenérgicos debido a un mecanismo de *downregulation*, sin que se observen cambios en la población de receptores β_2 -adrenérgicos. Es así como, frente a problemas cardíacos la proporción β_1 : β_2 cambia, pasando de 77:23 en corazones sanos, a 60:38 en corazones con problemas [26]. Sin embargo, no se ha determinado el efecto de este protocolo de estrés sobre los receptores β -adrenérgicos en el corazón de las crías hembras y tampoco se conoce qué estaría ocurriendo con estos receptores a lo largo del desarrollo de estos animales.

Junto con lo anterior, en nuestro laboratorio también se estudió el efecto de un protocolo de inyección con ISO subcutáneo (1 vez/día/10 días) en ratas machos adultas que fueron estresadas prenatalmente a través de una activación del SNS y se encontró que un 50% de las ratas estresadas murieron mientras que el grupo control presentó un 100% de sobrevivencia al ser inyectadas con la misma dosis de ISO. Junto con esto, se determinó que el ISO produjo un aumento en las concentraciones de los receptores β -adrenérgicos cardíacos [27]. Uno de los efectos del ISO descritos en la literatura es producir hipertrofia cardíaca y se ha visto que en animales que padecen de este problema cardíaco presentan una depleción del almacenamiento de catecolaminas endógenas lo que produce que el miocardio hipertrófico dependa de las catecolaminas circulantes. Junto con esto, presentan un aumento en la concentración de receptores β -adrenérgicos, algo que sumado a lo anterior, sería un mecanismo adaptativo y compensatorio que le permitiría al animal reaccionar frente a situaciones de estrés de la misma forma que lo haría un corazón normal [28-29]. Sin embargo, tomando en cuenta que existen diferencias de respuesta a estrés materno dependientes del género, el efecto que pueda producir el ISO en las crías hembras adultas es algo que aún no se ha estudiado por completo.

A la fecha, mediante trabajos realizados en nuestro laboratorio, se sabe que las ratas hembras adultas son más susceptibles a la estimulación β -adrenérgica con ISO

(debiendo utilizar dosis 40 veces menores que en los machos [30]) y que poseen una mayor concentración de receptores β -adrenérgicos junto con una mayor liberación de NA cardíaca [23]. Todo esto indicaría que las hembras estarían presentando una mayor sensibilidad a la estimulación adrenérgica, lo que se traduciría en una respuesta exacerbada a situaciones de estrés con respecto a ratas machos de la misma edad. Sin embargo, falta estudiar el efecto que estaría produciendo el protocolo de estrés por frío prenatal en el corazón de estas crías hembras.

Estrés y disfunción placentaria

Durante la gestación, la placenta juega un rol fundamental en el crecimiento y desarrollo fetal actuando como una interface vital entre la madre y el feto. Entre sus funciones están el transporte de nutrientes y oxígeno hacia la circulación fetal junto con la eliminación de productos de desechos hacia la circulación materna [31]. Tanto en humanos como en ratas, la placenta es de tipo hemocorial, es decir que las células trofoblásticas se encuentran en contacto directo con la sangre materna, sin tener endotelio entremedio [31-32]. Sin embargo también existen diferencias, por una parte la placenta humana se denomina hemomonocorial, puesto que consta de una sola capa de células trofoblásticas entre la circulación materna y fetal, estas células no son individuales sino que forman un sincicio en el cual funcionan como una sola unidad, por lo que se le conoce como sinciotrofoblasto [33]. Por otro lado, la placenta de rata es denominada hemotricorial, puesto que posee tres capas de células trofoblásticas entre la circulación materna y fetal. La capa externa de trofoblastos (la que se encuentra en contacto con la sangre materna) es celular, sin embargo la capa del medio y la interna son sinciciales [32].

Debido a su rol fundamental, cualquier cambio en la placenta podría generar graves efectos en el correcto desarrollo del feto. Por ejemplo, una situación de estrés en la madre podría afectar el correcto funcionamiento de la placenta. Esto quedó en evidencia a través de un protocolo de estrés por restricción (45 min/3 veces/día) a ratas gestantes durante los últimos 11 días de gestación luego del cual se observó una disminución en el crecimiento de los fetos junto con una fuerte disminución en la expresión y en la actividad de la enzima 11β -HSD2 (enzima encargada de la inactivación de la corticosterona mediante su oxidación) y una disminución en la

expresión de GLUT 1 (transportador de glucosa). Durante esta situación de estrés por restricción, los niveles de corticosterona maternos aumentan y puesto que la enzima 11 β -HSD2 se encuentra disminuida, no es capaz de cumplir su función habitual de proteger al feto del exceso de los glucocorticoides maternos, lo cual causaría que en la sangre fetal aumenten los niveles de corticosterona pudiendo generar la disminución del peso en las crías junto con programaciones fisiológicas en ellos [34].

Sin embargo, no solo situaciones de estrés pueden afectar a las placentas y, por lo tanto, programando a las crías, si no que también puede ocurrir en situaciones de insuficiencia placentaria. Por ejemplo, si se ligan ambas arterias uterinas en ratas con 19 días de gestación, se produce una disminución en el flujo sanguíneo a la placenta, causando hipoxia e isquemia, lo que produce que las crías sean más pequeñas y tengan niveles elevados de corticosterona junto con un aumento en la expresión y activación de los receptores de glucocorticoides en el hígado [35], lo que estaría imitando la situación de estrés por restricción [34]. En resumen, exposiciones prenatales tempranas a elevados niveles de glucocorticoides puede programar la expresión de diversos genes causando cambios a nivel cardiovascular (aumento en el tono cardiovascular y mayor presión arterial) y metabólicos (hiperglicemia e hiperinsulinemia) en las crías adultas [36].

Junto con lo anteriormente mencionado, se ha observado en diversos animales de estudio (ratas, conejos, monos, perros) que al generar una situación de insuficiencia placentaria a través de la reducción del flujo sanguíneo hacia la placenta (isquemia e hipoxia), se desarrolla proteinuria, aumento en las muertes fetales, menores pesos de los neonatos y aumento en la presión arterial, todos estos efectos se revierten una vez removida la ligación o luego de terminada la gestación [37]. En estos modelos de reducción del flujo sanguíneo uterino se observan características muy similares a las observadas en mujeres que padecen de preeclampsia, siendo esta una patología que puede presentarse durante el embarazo en mujeres y que se caracteriza por presentar una sobreactivación simpática [38]. Se ha observado que esta enfermedad es una respuesta de mala adaptación frente a una situación de estrés durante el embarazo en humanos [39] y la principal causa de ella es la placenta [40], puesto que se trataría de una mala adaptación inmunológica por parte de la madre hacia ésta [41]. Esta enfermedad se encuentra presente en el 5% de los embarazos y se caracteriza por no

presentar invasión de los trofoblastos en las arterias maternas, lo que causa una disminución en la oxigenación fetal, el transporte de nutrientes y el intercambio de gases hacia el lado fetal de la placenta [42].

Otra de las funciones de la placenta es mantener bajas las concentraciones de monoaminas en la circulación uteroplacental. Los trofoblastos expresan transportadores específicos que recaptan determinadas monoaminas tanto del plasma como del líquido amniótico, entre ellos se encuentra el transportador de NA (NET). Este transportador se encuentra tanto en placentas humanas [43] como en placentas de ratas [32], pertenece a la familia de transportadores dependientes de Na^+/Cl^- y es el transportador encargado de mantener constantes las concentraciones de NA en la circulación fetal [42, 44]. En placentas de pacientes con preeclampsia se ha observado una disminución en la expresión del NET [42, 45], esto se traduciría en un aumento en la concentración de catecolaminas en la sangre fetal, algo que ya se ha visto en ovejas [46] lo que podría tener efectos en los fetos y programar diversas funciones del gestante en su etapa postnatal. Sin embargo, aún no se ha estudiado qué estaría ocurriendo con estos transportadores en las placentas de ratas estresadas por frío prenatalmente.

En resumen, una sobreactivación simpática crónica durante el desarrollo prenatal de los organismos podría estar programando cambios en distintos niveles, tales como placentarios, cardiovasculares o metabólicos y estos efectos podrían depender en gran medida del género de la cría.

Debido a los antecedentes expuestos, es posible plantear la siguiente hipótesis:

Hipótesis

“El aumento de catecolaminas plasmáticas maternas producido por el estrés por frío durante la gestación disminuye la concentración de transportadores placentarios de noradrenalina junto con disminuir la razón de receptores β_1/β_2 -adrenérgicos cardíacos durante el desarrollo de la descendencia hembra, aumentando la sensibilidad a la estimulación simpática a nivel cardiovascular y metabólico”

Objetivo general

Determinar el efecto del estrés por frío en la madre gestante sobre los transportadores de noradrenalina placentarios, los receptores β -adrenérgicos cardíacos, función cardiovascular y metabólica de la descendencia hembra.

Objetivos específicos

1.- Determinar el efecto del estrés por frío en los niveles plasmáticos de catecolaminas maternas y en la concentración de transportadores de noradrenalina (NET) placentarios.

2.- Determinar el efecto del estrés por frío sobre la concentración de receptores β -adrenérgicos en el corazón de las crías hembras en diversas etapas del desarrollo (fetales, neonatas, prepúberes, adultas).

3.- Determinar *in vivo* el efecto del estrés por frío sobre la presión arterial y el desarrollo de hipertrofia cardíaca en condiciones basales y frente a una sobrecarga adrenérgica en las crías hembras adultas.

4.- Determinar el efecto del estrés por frío sobre la respuesta glicémica e insulínica frente a una sobrecarga de glucosa en las crías hembras adultas.

MATERIALES Y MÉTODOS

- **Animales**

Se utilizaron ratas hembras Sprague-Dawley con un peso entre 250 y 300 g. Los animales fueron mantenidos a 20°C y con un ciclo de luz:oscuridad de 12:12. El alimento y el agua permanecieron a libre disposición. Se realizó diariamente frotis vaginal a las ratas y cuando se encontraron en proestro, se dejaron durante la noche con una rata macho adulta y al día siguiente se confirmó la preñez con la presencia de un tapón de espermatozoides, considerando este día como día 0 de gestación.

Los animales que se encontraron preñados se dividieron en dos grupos. Un grupo control, el cual se mantuvo a una temperatura de 20°C constante durante todo el periodo de gestación y un grupo estrés, al cual se expuso a un protocolo de estrés por frío crónico intermitente durante todo el periodo de gestación (4°C/3h/5 días a la semana).

En adelante nos referiremos a las crías de las ratas controles como crías controles y a las crías de las ratas estresadas como crías estrés.

Todos los procedimientos con animales fueron aprobados por el comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile (números de protocolo: CBE2013-17 y CBE2012-18) cumpliendo con las directrices nacionales (CONICYT Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio). Se realizaron todos los esfuerzos necesarios para minimizar el número de animales utilizados y sus sufrimientos.

- **Obtención de las muestras**

En el momento del sacrificio, todos los animales fueron decapitados mediante el uso de una guillotina y se colectó la sangre para obtener el plasma sanguíneo para determinaciones de noradrenalina y de corticosterona.

- **15 y 19 días de gestación**

En el caso de las ratas preñadas de 15 y 19 días de gestación, se les extrajeron los fetos y las placentas, los cuales fueron pesados inmediatamente. Las placentas se almacenaron a -80°C o fueron fijadas en Bouin para luego ser incluidas en parafina o

se usaron inmediatamente para determinar la capacidad de incorporación de NA a través del NET presente en la placenta (trabajo de tesis de pregrado de Bioquímico de Jose Luis Fonseca).

Las crías de 19 días de gestación se pesaron, se les determinó el género y se les extrajo el corazón, los cuales fueron pesados frescos y almacenados a -80°C hasta el momento de su utilización o bien fijados en Bouin e incluidos en parafina.

Las crías de 15 días de gestación fueron pesadas y fijadas enteras en Formaldehído 4% para luego ser incluidos en parafina.

Además en todos los casos, se recolectó la sangre materna para luego ser centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos para realizar la separación del suero, este último se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso.

- **4 días postnatales**

Se pesaron las crías previas al sacrificio y se extrajeron los corazones, los cuales fueron pesados frescos y almacenados a -80°C para su posterior utilización.

- **20 y 60 días postnatales**

Se pesaron las crías previas al sacrificio. Se recolectó la sangre, la cual se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos para realizar la separación del suero, el cual fue almacenado a -80°C hasta el momento de su uso. Además, se extrajeron los corazones, los cuales fueron pesados frescos y almacenados a -80°C hasta el momento de su utilización o bien fijados en Bouin e incluidos en parafina.

• **Homogenización de tejido**

- **Determinación de receptores β -adrenérgicos**

a) Preparación de la fracción cruda de membranas:

Se pesaron 100 mg de la zona basal del corazón y se homogenizaron en ultraturrax con 0,7 mL de buffer Tris-HCl 20 mM/Sacarosa 0,25 M a pH 7,4. Luego se centrifugó a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C . Se descartó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió con 0,7 mL de buffer Tris-HCl 20 mM/Sacarosa 0,25 M a pH 7,4 y se volvió a centrifugar a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C . Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el precipitado en 0,7 mL de buffer Tris-HCl 20 mM/MgCl₂

10 mM pH 7,4 sin sacarosa y se midió la concentración de proteínas mediante el método de Bradford [47].

b) Determinación de receptores β -adrenérgicos

Se utilizaron tubos de vidrio, trabajando en duplicado, los cuales contenían las muestras de membranas obtenidas luego de la homogenización de tejidos (volumen equivalente a 300 μ g de proteína), 20 μ L de 3 H-DHA 10 nM, 20 μ L de Propranolol 10^{-5} M (solo para los tubos correspondientes a la unión inespecífica) y buffer Tris-HCl 20 mM/MgCl₂ 10 mM pH 7,4 sin sacarosa (en cantidad suficiente para completar 200 μ L como volumen final). Se incubaron los tubos durante 30 minutos a 37°C. Luego, se filtraron con filtros whatman GF/C en olla al vacío y se lavaron 3 veces con 2 mL de buffer Tris-HCl 20 mM/MgCl₂ 10 mM pH 7,4 sin sacarosa con Propranolol 10^{-5} M. Finalmente, se colocaron los filtros en viales de centelleo y se agregó 0,5 mL de agua destilada y 4 mL de mezcla de centelleo en cada vial, se agitó cada tubo en vortex y se midió la radioactividad en un contador de centelleo 24 horas después de realizado el ensayo [48-49].

Se trabajó con tubos correspondientes a la unión total de 3 H-DHA, a los cuales no se les agregó Propranolol, y con tubos correspondientes a la unión inespecífica de 3 H-DHA, a los cuales se les agregó Propranolol. Por lo tanto, para obtener la unión específica del Propranolol se realizó la resta entre las cuentas por minuto (cpm) obtenidas en los tubos correspondientes a la unión total y las cpm de los tubos que corresponden a la unión inespecífica. La eficiencia del equipo utilizado es de un 50%, por lo que las cpm obtenidas corresponden a la mitad de las desintegraciones por minuto (dpm).

- **Determinación de Noradrenalina por HPLC**

a) En corazón

Se pesaron los corazones, se homogenizaron en ultraturrax con 300 μ L de ácido perclórico (PCA) 0,2 N y se centrifugaron a 12.000 rpm por 15 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró a través de filtros Millex-GV para jeringas de 0,22 μ m de poro (Millipore) y se utilizó para determinar NA por HPLC.

Se utilizó un equipo HPLC Jasco PU-2089S Plus acoplado a un detector electroquímico ECD-700S. Se inyectaron 20 µL de la solución obtenida, con el equipo calibrado a una potencia de 650 mV y un flujo constante de 1,0 mL/min.

b) En plasma

Se realizó esta determinación en el suero de madres gestantes y en el suero de las crías de 20 días postnatales. En ambos casos se trabajó con 100 µL de suero. A cada muestra se le agregaron 20 µL de DHBA 100 pg/µL, el cual se utilizó como estándar interno y se completó volumen a 200 µL con PCA 0,2 N. A todo esto se le realizó el procedimiento de adsorción por alúmina y se eluyeron las catecolaminas con 100 µL de PCA 0,2 N. Esta elución obtenida fue la solución que se inyectó al HPLC para la determinación de NA plasmática.

Se utilizó un equipo HPLC Jasco PU-2089S Plus acoplado a un detector electroquímico ECD-700S. Se inyectaron 20 µL de la solución obtenida, con el equipo calibrado a una potencia de 650 mV y un flujo constante de 1,0 mL/min.

- **Determinación de glucosa plasmática**

Se determinaron las concentraciones de glucosa plasmática en ratas hembras adultas de 60 días mediante el uso de tiras reactivas Accu-chek Active. Se les extrajo sangre mediante el corte de la punta de la cola luego de una noche de ayuno y se determinó la concentración de glucosa a los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 minutos luego de una administración oral de 2 g de glucosa/kg de peso de una solución al 40%. A cada tiempo se colectó sangre suficiente para una posterior determinación de insulina plasmática. Estas muestras de sangre fueron centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C, se recolectó el suero y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

- **Determinación de corticosterona e insulina plasmática por kit de ELISA**

Se determinaron los niveles de corticosterona en plasma de ratas hembras no gestantes controles y ratas gestantes de 15 y 19 días de gestación controles y estrés. Esto fue realizado mediante ELISA (55-CORMS-E01, ALPCO, lote número 022). La sensibilidad de este kit es de 4,1 ng/mL, presentando una reactividad cruzada no detectable con hormonas esteroidales, 0,2% con aldosterona, 0,3% con cortisol y 0,7%

con progesterona. La variabilidad intra ensayo es de menos de 8,3% y la variabilidad inter ensayo es de menos de 12,4%.

Se determinaron los niveles de insulina en plasma de ratas hembras adultas de 60 días controles y estrés. Esto fue realizado mediante ELISA (80-INSRT-E01, E10, ALPCO). La sensibilidad de este kit es de 0,124 ng/mL, el kit presenta un 120% de reactividad cruzada con insulina humana pero menos de 0,01% con el péptido C de ratas. La variabilidad intra ensayo es de menos de 5,8% y la variabilidad inter ensayo es de menos de 0,95%.

- **Determinación del índice HOMA**

El índice HOMA se utilizó para determinar presencia o ausencia de resistencia a la insulina, se calculó a través de la siguiente fórmula [50-52]:

$$HOMA = \frac{\text{glucosa en ayuna} \left(\frac{\text{mmol}}{\text{L}} \right) \times \text{insulina en ayuna} \left(\frac{\text{mU}}{\text{L}} \right)}{22,5}$$

Se consideró presencia de resistencia a la insulina cuando el índice daba mayor a 2,5.

- **Determinación de la expresión génica de los NET placentarios y los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos cardíacos a través de PCR en tiempo real**

Se determinaron los cambios en la expresión de *SLC6A2* (transportador de noradrenalina) en las placentas de crías de 15 y 19 días de gestación, *ADRB1* (receptor β_1 -adrenérgico) y *ADRB2* (receptor β_2 -adrenérgico) en los corazones de las crías hembras de 19 días de gestación, 4 días, 20 días y 60 días postnatales. Para esto, se extrajo el ARN total a través del método de Chomczynski [53] para luego utilizar 5 μg de ARN de cada una de las muestras en la reacción de transcripción reversa para obtener ADN complementario. La reacción se lleva a cabo usando 0,5 mM dNTPs, 10 mM DTT, 3,75 ng/mL partidores randomizados (Invitrogen), 40 U RNasaOUT (Invitrogen) y 200 U de transcriptasa reversa SuperScript® II (Invitrogen), se incubó a 25°C por 10 minutos, a 42°C por 50 minutos y a 70°C por 15 minutos. Luego, los ADN complementarios obtenidos se amplificaron mediante la técnica de PCR en tiempo real, utilizando partidores específicos para cada uno de los genes nombrados anteriormente. Cada muestra se analizó en triplicado con un volumen de reacción de 20 μL : 10 μL de 2X Brilliant II SYBR® Green QPCR Master Mix (Agilent

Technologies) + 7 μ L de agua DEPC + 0,5 μ L de cada uno de los partidores y 2 μ L de ADN complementario para *SLC6A2* y *ADRB2*. Para *ADRB1* se utilizaron 7,3 μ L de agua DEPC y 0,3 μ L de cada uno de los partidores, manteniendo los volúmenes de ADN complementario y de SYBR Green. Se procedió a activar la polimerasa a 95°C por 10 min y luego se realizó un protocolo de amplificación en el termociclador MJ Research PCR tiempo real (MJ Research, modelo PT-200, Inc., Watertown, MA).

Tabla 1: Condiciones de la reacción de PCR para cada uno de los genes determinados

Genes	Activación polimerasa	Desnaturalización del ADN	Alineamiento de los partidores	Elongación de la cadena
<i>18S</i> y <i>SLC6A2</i>	95°C por 5 min	95°C por 20s	60°C por 20s	72°C por 30s
<i>ADRB1</i> y <i>ADRB2</i>	95°C por 5 min	95°C por 20s	61°C por 20s	72°C por 30s

Se realizó una curva de melting entre temperaturas de 72°C y 85°C bajo medición continua de fluorescencia para ver especificidad del producto formado. Para cada uno de los productos formados se observó una sola amplificación a una temperatura determinada, lo que demostró que cada par de partidores utilizados era específico para un solo producto de la amplificación. Se realizó una curva estándar a través de diluciones seriadas de una muestra de concentración conocida y en esta curva se interpolaron los distintos ciclos en el cual se observó el aumento lineal del producto de PCR (dato entregado por el equipo), de ahí obtuvimos la cantidad de ARN mensajero inicial para cada gen de interés. El resultado final se calculó normalizado por la expresión del gen constitutivo *18S*.

Tabla 2: Secuencias de los partidores utilizados para cada gen de interés

Genes	Forward	Reverse
<i>18S</i>	5'-TCAAGAACGAAAGTCGGAGG-3'	5'-GGACATCTAAGGGCATCACA-3'
<i>SLC6A2</i>	5'-GGACAGGTTTCAGCAATGACATCCA-3'	5'-ATGCTGACCACTACCACAAACAGG-3'
<i>ADRB1</i>	5'-TCGTAGTGGGCAACGTGTTGGTGAT-3'	5'-GTCTACCGAAGTCCAGAGCTCACAGAA-3'
<i>ADRB2</i>	5'-CAGGCCTATGCTATCGCTTCCTCTAT-3'	5'-GGCTGAGGTTTTGGGCATGAAATC-3'

- **Determinación de las proteínas de los NET placentarios y los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos cardíacos por western blot**

- a) Extracción y cuantificación de proteínas

Se determinaron los cambios en las proteínas de SLC6A2 (transportador de NA) en las placentas de crías de 15 y 19 días de gestación, ADRB1 (receptor β_1 -adrenérgico) y ADRB2 (receptor β_2 -adrenérgico) en los corazones de las crías hembras de 4 días, 20 días y 60 días postnatales.

Los corazones de crías hembras fueron homogenizados en buffer de LISIS (Tris-HCl 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA pH 8,0 50 mM, SDS 1%), en cambio las placentas de crías de 15 y 19 días de gestación fueron homogenizadas en buffer RIPA (Tris-HCl pH 7,2 10 mM, Tritón X-100 1%, NaCl 150 mM, SDS 0,1%). Independiente del tejido, la homogenización se realizó en hielo en vidrio-vidrio, el homogenizado fue centrifugado a 13.000 rpm por 20 minutos a 4°C. La concentración de proteínas fue determinada mediante el método de Bradford [47], todas las muestras fueron trabajadas en duplicado con una dilución 1/10 y se midió absorbancia a 595 nm. La curva de calibración se realizó con albúmina de suero bovino. A cada muestra se le agregó ¼ del volumen de buffer de carga 4X (Tris-Base 0,6 g; SDS 1,84 g; glicerol 8 g; azul de bromofenol 0,1% (p/v) 4 mL; β -mercaptoetanol 4 mL, volumen final 20 mL, se ajusta a pH 6,8 con HCl), se hicieron alícuotas con 15 μ g de proteínas en el caso de las placentas o de 20 μ g para los corazones, se completó volumen a 5 μ L con buffer de carga 1X y se calentaron a 95°C por 5 minutos.

- b) Electroforesis y Western Blot

Todo lo detallado a continuación se realizó de la misma forma tanto para las placentas como para los corazones. Se trabajó con geles de 1 mm, gel resolutivo al 10% y gel concentrador al 5%. La electroforesis se realizó a 100V durante 90 minutos en un buffer de electroforesis 1X (Tris-Base 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v), SDS 0,1% (p/v); pH 8,6). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa de poro de 0,45 μ m a 400 mA por 90 minutos en hielo en un buffer de transferencia 1X (Tris-Base 0,5% (p/v), glicina 2,4% (p/v), metanol 20% (v/v)). Luego de realizada la transferencia se tiñeron las membranas con Rojo Ponceau al 5% para verificar la correcta realización de la transferencia, se lavaron con agua de la llave y luego se lavaron tres veces con

tampón de TBST (Tris-Base 0,224% (p/v), NaCl 0,8% (p/v), Tween 20 0,1% (v/v), ajustar a pH 7,6) durante 5 minutos cada vez hasta retirar totalmente la tinción. Se bloquearon los sitios de unión inespecíficos de las membranas con leche al 5% durante una hora a temperatura ambiente. Se volvieron a lavar las membranas tres veces con tampón TBST durante 5 minutos cada vez y se incubaron con los anticuerpos primarios respectivos disueltos en 5% de leche a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se volvieron a lavar tres veces con tampón TBST durante 5 minutos cada vez y se incubó a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario disuelto en 5% de leche por una hora. Se lavaron tres veces con tampón TBST durante 5 minutos cada vez y se revelaron. El revelado se realizó por quimioluminiscencia con el reactivo EZ-ECL. La proteína que se utilizó como control de carga en todos los casos fue GAPDH. Los resultados se obtuvieron a través de la medición de la intensidad de las bandas, las cuales fueron normalizadas en relación a la expresión de GAPDH. Los anticuerpos utilizados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 3: Detalle de los anticuerpos utilizados

Anticuerpos	Tipo de anticuerpo	Dilución del anticuerpo	Tejido utilizado
SLC6A2	Primario	1:1000	Placentas
ADRB1	Primario	1:3000	Corazones
ADRB2	Primario	1:2500	Corazones
GAPDH	Primario	1:40000	Placentas y corazones
Anti-Rabbit	Secundario	1:10000	Placentas y corazones

- **Determinación de ³H-NE incorporación por los NET placentarios**

Se determinó la respuesta funcional de los NET a través de la medición de la incorporación de ³H-NA por las placentas de las crías de 15 y 19 días de gestación. Las placentas se incubaron bajo dos condiciones: en buffer Krebs a 37°C por 60 min con 2 µCi/mL ³H-NA con o sin cocaína. La cuantificación en presencia de 10µM de cocaína (un inhibidor específico de la recaptación de monoaminas [54]) nos entregó la incorporación específica de NA *in vitro* a través del NET placentario sensible a cocaína.

- **Sobrecarga adrenérgica crónica mediante administración de Isoproterenol**

Se determinó la respuesta frente a una sobrecarga adrenérgica crónica en ratas hembras adultas de 60 días controles y estrés, a las cuales se les administró una dosis de 125 µg/mL de ISO (agonista β adrenérgico) subcutánea por 10 días [22]. Al día 11 luego de iniciado el protocolo de inyección, se sacrificaron los animales mediante uso de guillotina y se colectaron los corazones, se eliminaron las aurículas, se pesaron y se fijaron en Bouin para ser incluidos en parafina.

- **Determinación de área y perímetro de los cardiomiocitos**

Los corazones que se encontraban incluidos en parafina fueron cortados en la parte central del corazón y se tiñeron con Hematoxilina-Eosina o con Tricromo-Masson (nos permite observar el colágeno de una coloración verde-azulosa) para luego ser examinados en un microscopio de luz. Se realizaron cinco cortes seriados de 5 µm de espesor de cada corazón. Se capturaron las imágenes a través de una cámara de video (OLYMPUS) fijada a un microscopio (OLYMPUS) y proyectadas a un monitor, mediante un software de análisis Micrometrics®, en el cual se fijó la imagen. Esto se realizó a un aumento óptico de 4x, capturando imágenes del corazón completo para la determinación del porcentaje de colágeno presente a través del programa Image Pro Plus 6,0; además de capturar imágenes a un aumento óptico de 40x para la determinación del área y perímetro de los cardiomiocitos a través del programa Image J, lo cual se realizó en 100 cardiomiocitos por corazón, solo fueron seleccionadas las células en las cuales se observaba claramente los bordes y el núcleo. Para el análisis estadístico tanto del área como del perímetro, se ingresaron los valores de cada célula como unidad individual.

- **Análisis Estadístico**

Para el análisis estadístico de las muestras, se utilizó el programa Graphpad Prism 5. Los resultados se expresaron como promedio ± SEM. Cuando se compararon dos grupos se utilizó un test de student de dos colas, sin embargo cuando se compararon tres o más grupos se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls, estableciendo en ambos casos una significancia estadística con un $p < 0,05$.

RESULTADOS

1) Etapa prenatal

Objetivo específico 1.- Determinar el efecto del estrés por frío en los niveles plasmáticos de catecolaminas maternas y en la concentración de transportadores de noradrenalina (NET) placentarios.

A) Efecto de la preñez y del estrés crónico durante la gestación sobre las concentraciones de NA plasmática

El protocolo de estrés por frío ha sido clasificado como un protocolo de estrés simpático produciendo la activación del SNS con la consiguiente liberación de NA [4-5, 18], pero no se ha visto su efecto en ratas gestantes.

Primero, se determinaron las concentraciones de NA en animales controles no gestantes y gestantes para ver posibles cambios ligados a la preñez. Se observó que durante la gestación existió una disminución en las concentraciones de NA plasmática en ratas y esta disminución se acentuó hacia el término de la preñez (Figura 1A). Por otro lado, debido al protocolo de estrés se observó un aumento en la concentración de NA a los 19 días de gestación, sin encontrar cambios a los 15 días de gestación (Figura 1B).

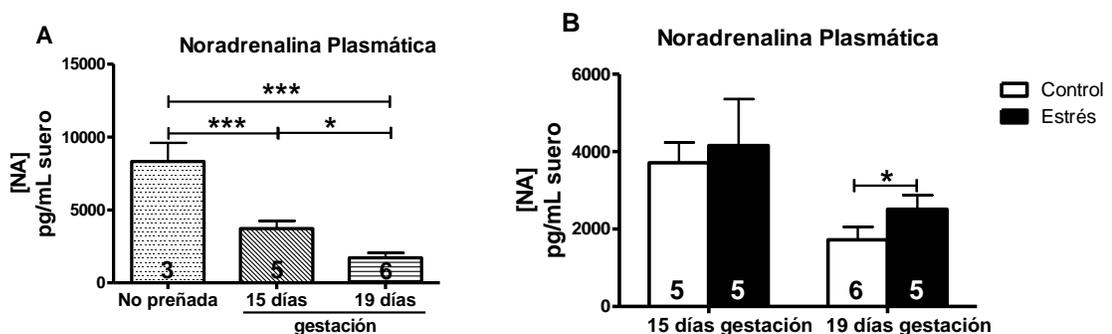


Figura 1: **Concentración de NA plasmática en ratas.** A.- En animales controles no gestantes y gestantes de 15 y 19 días de gestación. B.- En animales gestantes de 15 y 19 días de gestación controles y estrés. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

B) Efecto de la preñez y del estrés crónico durante la gestación sobre los niveles de corticosterona plasmática

De acuerdo a la literatura, este protocolo de estrés por frío produce efectos exclusivamente simpáticos, sin observar cambios en los niveles de corticosterona plasmática [18], pero esto es algo que no ha sido estudiado en ratas gestantes.

Se determinaron las concentraciones de corticosterona en animales controles no gestantes y gestantes para ver cambios ligados a la preñez. Se observó un aumento en las concentraciones de corticosterona plasmática en ratas gestantes de 19 días de gestación (Figura 2A). Por otro lado, se observó un aumento en los niveles de corticosterona plasmáticos tanto a los 15 como a los 19 días de gestación en las ratas estrés (Figura 2B).

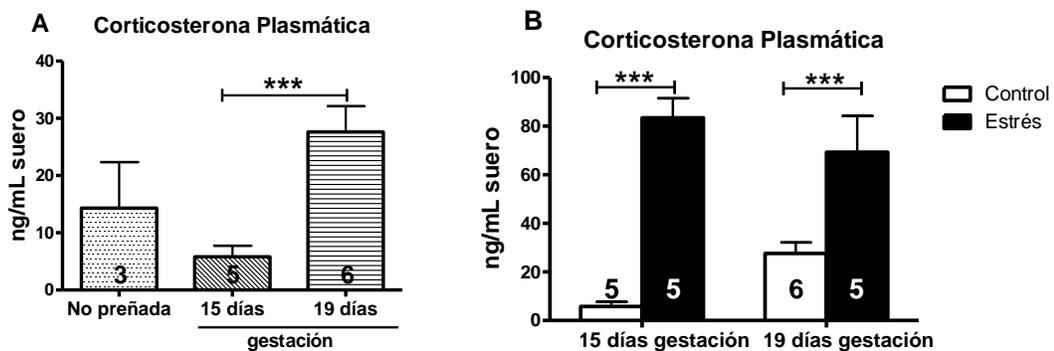


Figura 2: **Concentración de corticosterona plasmática en ratas.** A.- En animales controles no gestantes y gestantes de 15 y 19 días de gestación. B.- En animales gestantes de 15 y 19 días de gestación controles y estrés. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. *** $p < 0,001$.

C) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre el número, el peso de las crías y sus placentas

No se observaron diferencias en el número de crías totales ni en el número de crías separadas por género entre animales controles y estrés. Las crías de 15 días de gestación no presentan dimorfismo sexual por lo que no fueron separadas por género (Tabla 4).

Sin embargo, tanto a los 15 como a los 19 días de gestación se observó un aumento en el peso de los fetos estrés junto con un aumento en el peso de sus placentas (Figura 3 y 4), sin observar cambios en la eficiencia placentaria.

Tabla 4: Comparación en el número de crías y el número de crías separadas por género entre animales que fueron estresados durante la gestación y controles.

	Control	Estrés
Número crías (totales)		
15 días gestación	14,4 ± 1,2 (n=5 madres, 72 crías)	13,4 ± 0,8 (n=5 madres, 67 crías)
19 días gestación	13,3 ± 1,0 (n=6 madres)	13,8 ± 0,9 (n=5 madres)
Número crías (por género)		
19 días gestación	Hembras: 7,0 ± 0,7 (n=42 crías)	Hembras: 7,0 ± 0,4 (n=35 crías)
	Machos: 6,3 ± 0,6 (n=38 crías)	Machos: 6,8 ± 0,9 (n=34 crías)

Los resultados corresponden al promedio ± error estándar medio. El número de animales se encuentra indicado en cada caso.

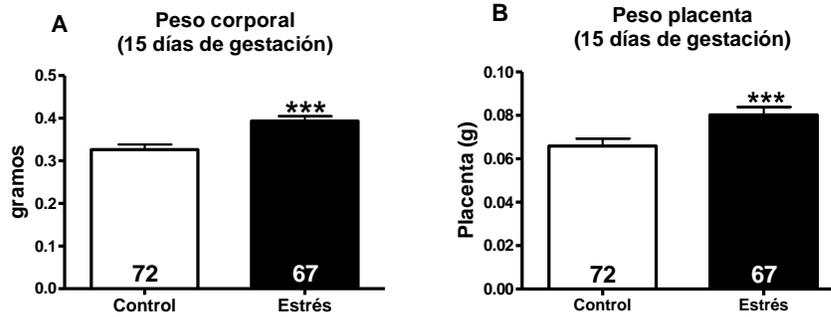


Figura 3: **Peso de las crías y de sus placentas a los 15 días de gestación.** A.- Peso de las crías controles y estrés. B.- Peso de las placentas de las crías controles y estrés. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de t-student. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. *** $p < 0,001$.

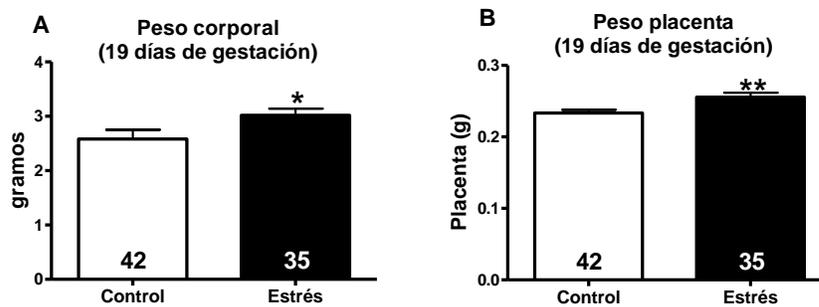


Figura 4: **Peso de las crías y de sus placentas a los 19 días de gestación.** A.- Peso de las crías hembras controles y estrés. B.- Peso de las placentas de las crías hembras controles y estrés. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de t-student. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

D) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los NET placentarios

Los NET placentarios son los encargados de mantener el *clearance* de NA del feto hacia la madre [55]. En este trabajo, se observó un aumento en las concentraciones de NA plasmáticas maternas debido al estrés simpático (Figura 2B), debido a esto se determinaron los NET placentarios para determinar un posible efecto fetal de este aumento de NA.

Primero, se determinó la incorporación de ^3H -NA por las placentas de las crías, lo cual al ser cuantificado en presencia de cocaína (inhibidor específico de la recaptación de monoaminas [54]) da cuenta de la funcionalidad de los NET (trabajo de tesis de pregrado de Bioquímico de Jose Luis Fonseca). Se observó una disminución en la incorporación a los 19 días de gestación por las placentas de crías estrés, sin encontrar diferencias a los 15 días de gestación (Figura 5A).

Para determinar si esta diferencia se debía a cambios en la cantidad de los NET se realizaron un qPCR y un *western blot*. Al determinar ARN mensajero se observó un aumento en el NET a los 19 días de gestación en comparación con los 15 días de gestación en placentas controles. Sin encontrar diferencias en las placentas estrés (Figura 5B).

Al realizar un *western blot* para determinar la proteína de estos transportadores se obtuvieron tres bandas: 80, 55 y 46 kDa (Figura 6A). Estas corresponden a distintos grados de glicosilación de la proteína dependiendo de su nivel de madurez: 80kDa corresponde a la proteína madura, activa y completamente glicosilada, 55 kDa a la proteína medianamente glicosilada y 46kDa a la proteína inmadura sin glicosilaciones [43, 56]. Puesto que solo es activa la proteína de 80kDa se cuantificó solamente esta banda. Se observó un aumento en la cantidad de NET en placentas estrés a los 19 días de gestación, tanto en comparación con las placentas estrés de 15 días de gestación como con las placentas controles de 19 días de gestación (Figura 6B).

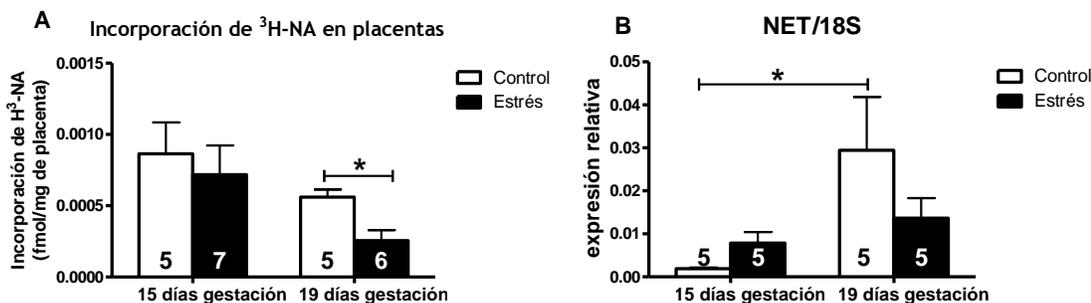


Figura 5: **Incorporación de 3H-NA y ARN mensajero de NET en placentas de 15 y 19 días de gestación.** **A.-** Incorporación de H-NA por placentas de crías controles y estrés de 15 y 19 días de gestación. **B.-** Determinación de RNA mensajero a través de qPCR para NET en placentas de crías controles y estrés de 15 y 19 días de gestación. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. * $p < 0,05$.

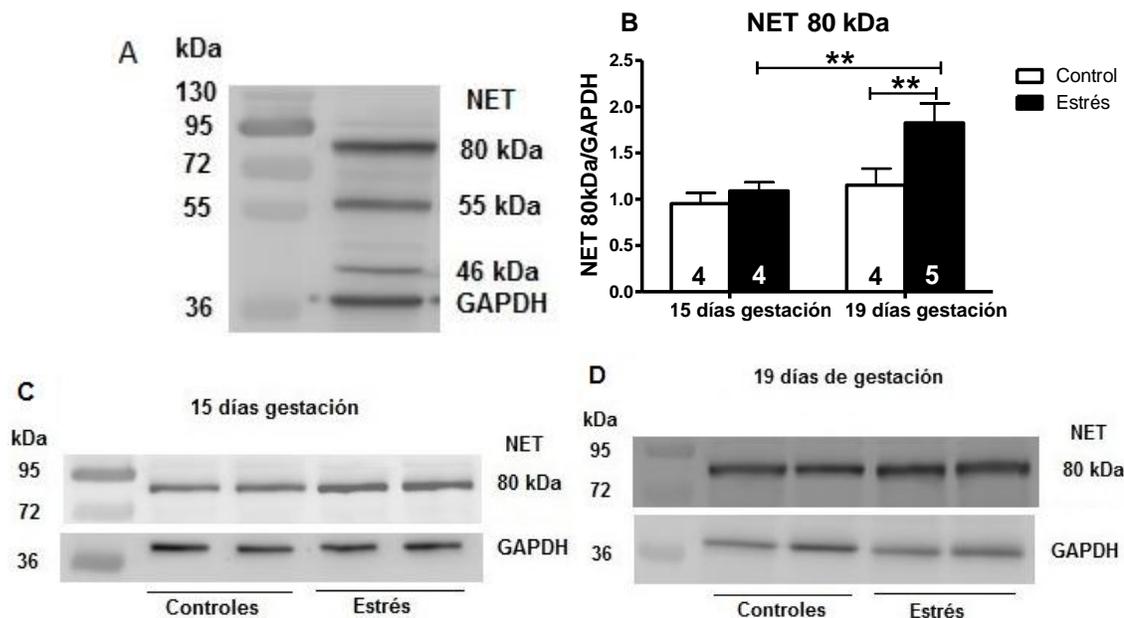


Figura 6: **Cuantificación de proteínas de NET mediante western blot en placentas** de crías controles y estrés de 15 y 19 días de gestación. **A.-** Membrana representativa de las tres bandas (80 kDa, 55 kDa y 46 kDa) obtenida del NET en placentas de ratas. **B.-** Cuantificación de la proteína madura de NET placentarios. Membranas representativas de la banda de 80 kDa de los *western blot* realizados en placentas controles y estrés de **C.-** 15 días de gestación y **D.-** 19 días de gestación. A los 19 días de gestación los resultados son solo de placentas de crías hembras. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio de tres experimentos independientes. Se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. ** $p < 0,01$.

2) Etapa postnatal

Objetivo específico 2.- Determinar el efecto del estrés por frío sobre la concentración de receptores β -adrenérgicos en el corazón de las crías hembras en diversas etapas del desarrollo (fetales, neonatas, prepúberes, adultas).

A) Efecto del estrés crónico durante la gestación, sobre la alimentación y la ganancia de peso en ratas gestantes controles y estrés

Se realizaron registros diarios del peso (Figura 7A) de seis ratas preñadas controles y de cinco ratas estrés junto con el registro del peso del alimento que consumieron estos animales (Figura 7B) durante todo el periodo de gestación. No se observaron diferencias en el aumento del peso de las ratas, sin embargo se determinaron diferencias en la cantidad de comida ingerida diariamente durante la gestación, encontrando que las ratas controles comieron más que las estrés.

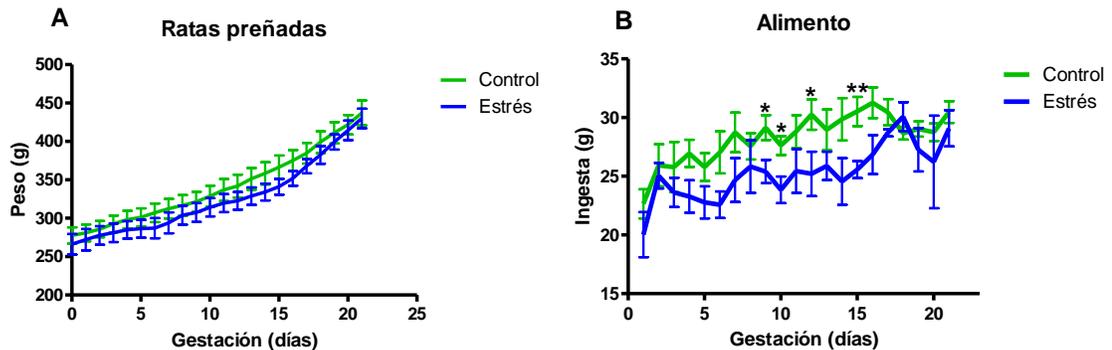


Figura 7: **Peso diario de las ratas preñadas y de lo que comen durante el periodo de gestación.** A.- Peso diario de ratas preñadas controles y estrés. B.- Peso diario de lo que comen las ratas preñadas controles y estrés. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. Se utilizó un análisis de t-student. Los resultados corresponden a seis ratas controles y cinco ratas estrés. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

B) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los días de gestación, número de crías totales, número de crías separadas por género, pesos de las crías hembras y sus corazones en etapa prenatal y postnatal

No se observaron diferencias en los días de gestación, el número de crías totales ni número de crías separadas por género entre animales controles y estrés (Tabla 5).

Tabla 5: Comparación en los días de gestación, el número de crías y el número de crías separadas por género entre animales que fueron estresados durante la gestación y controles.

	Control	Estrés
Días de gestación	21,8 ± 0,2 (n=8)	21,9 ± 0,1 (n=12)
Número crías (totales)	14,3 ± 0,3 (n=8 madres, 100 crías)	12,1 ± 1,1 (n=12 madres, 133 crías)
Número crías (por género)		
Hembras	Hembras: 7,0 ± 0,7 (n=49 crías)	Hembras: 6,2 ± 0,7 (n=68 crías)
Machos	Machos: 7,2 ± 0,8 (n=51 crías)	Machos: 5,9 ± 0,8 (n=65 crías)

Los resultados corresponden al promedio ± error estándar medio. El número de animales se encuentra indicado en cada caso.

Para determinar si el estrés por frío generaría efectos sobre el crecimiento de las crías y el desarrollo de sus corazones, se determinó el peso de las crías hembras y el de sus corazones tanto durante la etapa prenatal como durante la etapa postnatal.

A la edad prenatal de 15 días de gestación no fue posible diferenciar género a través de dimorfismo sexual por lo que los resultados presentados en la figura 8A incluyen todas las crías obtenidas. Además, a esta edad no fue posible obtener los corazones es por lo tanto en la figura 8B no se incluye esta edad.

Se observó que el aumento en tamaño de las crías hembras durante la etapa prenatal no se mantuvo en la etapa postnatal (Figura 8A), sin embargo se observó que sí se mantuvo el aumento en el tamaño de los corazones (a los 19 días de gestación, 20 y 60 días postnatales) (Figura 8B).

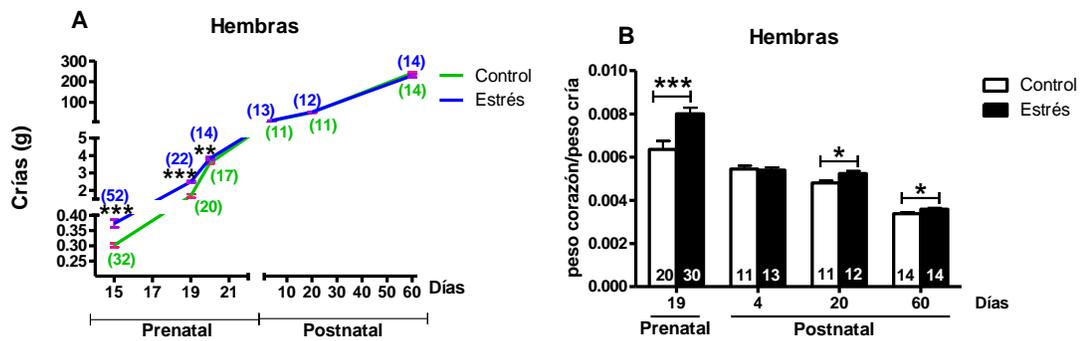


Figura 8: **Peso de las crías hembras y de sus corazones a distintas edades.** **A.-** Peso de las crías hembras estrés y controles a distintas edades prenatales (15 y 19 días de gestación) y postnatales (4, 20 y 60 días postnatales). **B.-** Razón del peso de los corazones/peso de las crías hembras controles y estrés a distintas edades prenatales (15 y 19 días de gestación) y postnatales (4, 20 y 60 días postnatales). Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de t-student. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

C) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los niveles de noradrenalina plasmática y cardíaca en crías hembras

a) Noradrenalina plasmática

Se cuantificaron los niveles de NA plasmática en el suero de crías hembras controles y estrés de 20 y 60 días postnatales mediante técnica de HPLC. A los 4 días postnatales no se colectó sangre puesto que son animales muy pequeños y no obtendríamos el volumen necesario para obtener suero para la determinación de NA a través de esta técnica.

En animales controles, se observó que a los 60 días presentaron mayores concentraciones de NA que a los 20 días (Figura 9A). No se encontraron diferencias en animales estrés (Figura 9B y C).

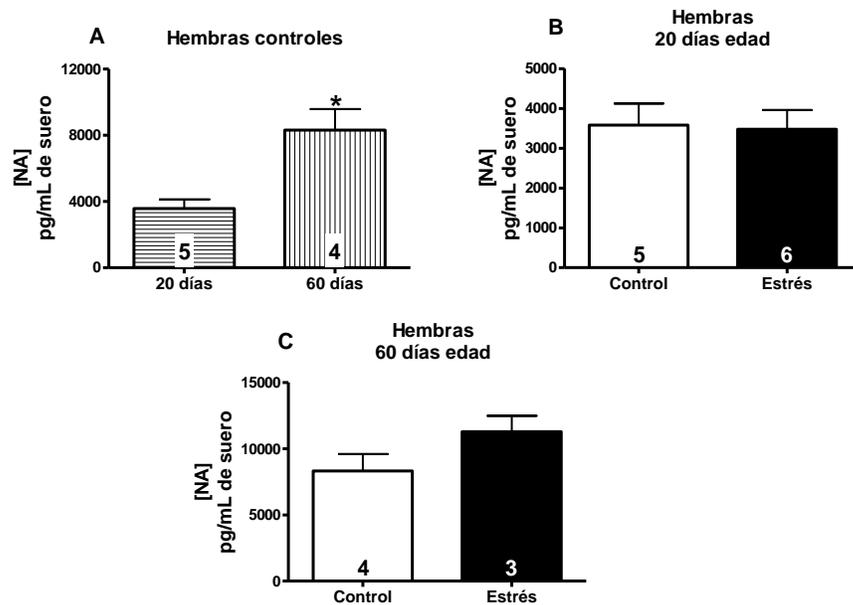


Figura 9: **Concentración de NA plasmática de crías hembras.** A.- Concentración de NA en suero de crías hembras controles y en suero de crías hembras controles y estrés de B.- 20 días y C.- 60 días postnatales. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. En los tres casos se utilizó un análisis de t-student. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico.

b) Noradrenalina cardíaca

Se cuantificaron los niveles de NA en el corazón de crías hembras controles y estrés de 4, 20 y 60 días postnatales mediante técnica de HPLC. En animales controles, se observó que a los 20 días aumentaron las concentraciones de NA cardíacas en comparación a los 4 días, manteniéndose elevadas a los 60 días (Figura 10A). No se encontraron diferencias en animales estrés (Figura 10B, C y D).

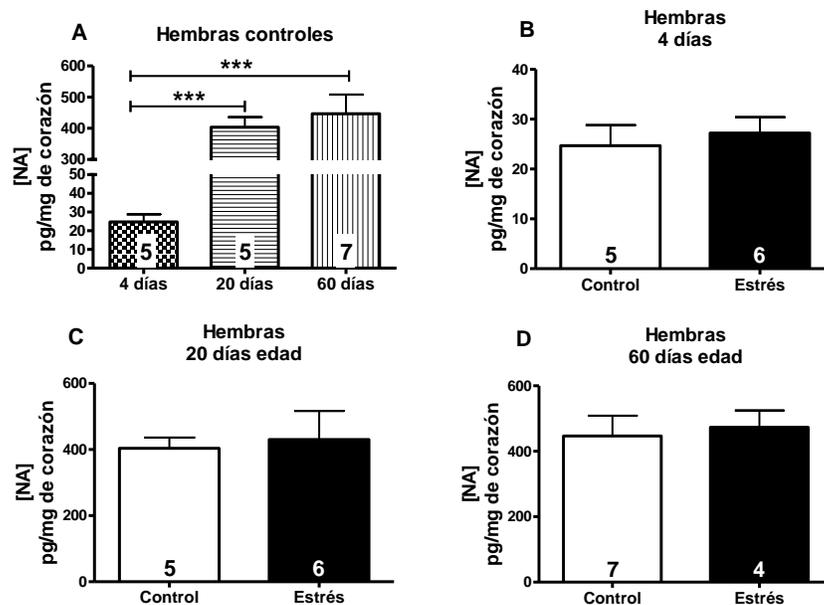


Figura 10: **Concentración de NA en corazones de crías hembras.** A.- Concentración de NA cardíaca en crías hembras controles y en corazones de crías hembras controles y estrés de B.- 4 días, C.- 20 días y D.- 60 días postnatales. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. En A.- se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls, en B, C y D se utilizó un análisis de t-student. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. *** $p < 0,001$.

D) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los niveles de receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos en corazones de ratas hembras

Previamente en este trabajo, se determinó un aumento en las concentraciones de NA plasmáticas maternas (Figura 2B) junto con una disminución de la funcionalidad de los NET placentarios (Figura 5A), esto podría traducirse en que los fetos se estén desarrollando en un medio con exceso de NA. Por ello quisimos ver qué estaría ocurriendo con uno de los subtipos de los receptores de NA: los receptores β -adrenérgicos. Como ya se demostró que este protocolo de estrés estaría causando un aumento en el peso de los corazones de las crías (Figura 8B), se decidió determinar los receptores β -adrenérgicos a nivel cardíacos.

Se comenzó determinando estos receptores en corazones de ratas de 20 y 60 días a través de la técnica de radioligando, para así cuantificar concentraciones totales de receptores β -adrenérgicos (mediante uso de Propanolol) junto con sus afinidades a través de esta misma técnica utilizando cambios en las concentraciones del fármaco. Al ser este experimento un ensayo de desplazamiento no permite calcular la K_d (constante de disociación) ni realizar el gráfico de scatchard con estos resultados, puesto que se trabajó con distintas concentraciones de Propanolol no marcado el cual desplaza la unión de un radioligando (^3H -DHA, dihidroalprenolol tritiado) que se encuentra en concentraciones constantes. Sin embargo, estos ensayos de desplazamiento permiten calcular la IC_{50} (dosis necesaria de fármaco para obtener el 50% de desplazamiento de la unión del compuesto marcado), al hacer una extrapolación en las curvas de desplazamiento de la concentración de Propanolol que corresponde al 50% de la unión inespecífica [57-58].

Se observó que no existen diferencias en las curvas de desplazamiento con propanolol en corazones de crías hembras de 20 días (Figura 11A), sin embargo se observó un aumento en la IC_{50} (Figura 11C) a los 60 días. Además, se observó una disminución significativa en la IC_{50} en las hembras controles de 60 días en comparación con las de 20 días (Figura 11C). No se encontraron diferencias en la concentración de los receptores β -adrenérgicos en los corazones de las crías hembras estrés de 20 y 60 días (Figura 11D).

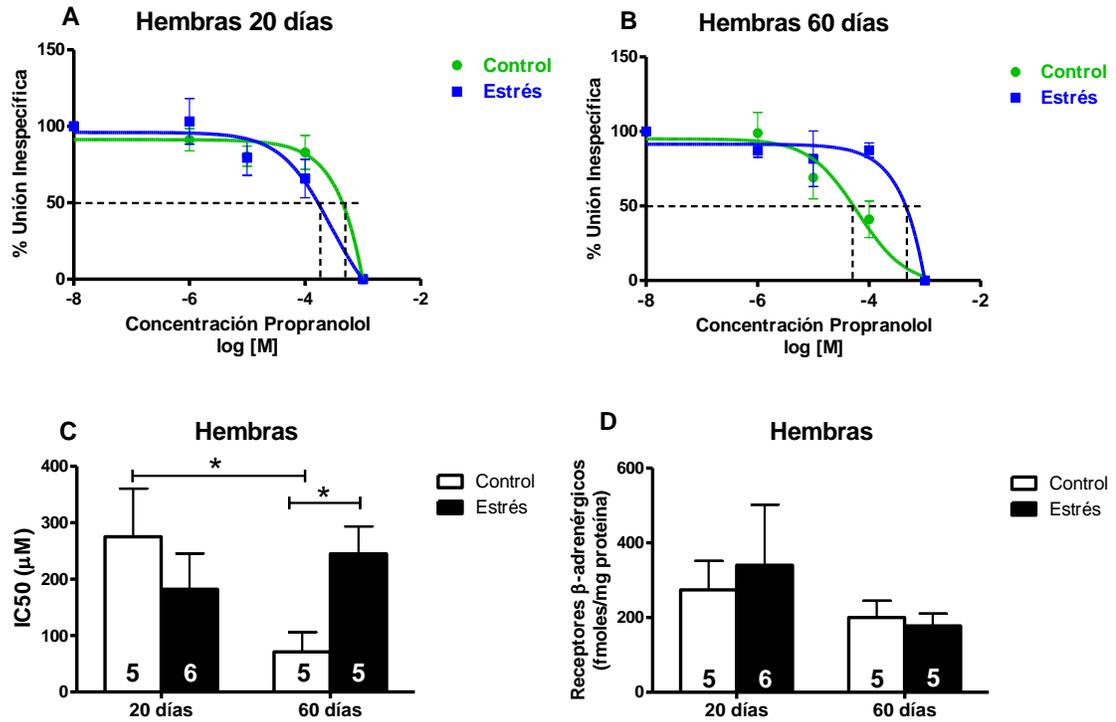


Figura 11: **Porcentaje de unión total, afinidad y concentración de receptores β -adrenérgicos** en membranas cardíacas de ratas hembras. Porcentaje de unión inespecífica de la fracción de membranas cardíacas de ratas hembras de **A.-** 20 días y **B.-** 60 días luego del desplazamiento competitivo mediante propranolol. **C.-** IC50 para propranolol y **D.-** concentración de receptores β -adrenérgicos en las membranas cardíacas de ratas hembras controles y estrés de 20 y 60 días. En ambos casos se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en los gráficos. * $p < 0,05$.

Además, se realizó la determinación de los receptores β -adrenérgicos cardíacos a través de qPCR (ARN mensajero) y de *western blot* (proteína), lo que se presenta a continuación.

a) Receptores β_1 -adrenérgicos

Al analizar los resultados en las ratas hembras controles, se observó que los niveles de ARN mensajero de los receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos (Figura 12A) presentaron variaciones con la edad. En los neonatos de 4 días se observó un aumento en comparación con los 19 días de gestación, lo que se revirtió a los 20 días, para luego aumentar nuevamente a los 60 días. Estas variaciones no se observaron en las crías estrés, en las cuales las concentraciones se mantuvieron elevadas desde los 4 días hasta los 60 días (Figura 13A).

Al determinar la proteína de estos receptores en los corazones de las ratas hembras controles, se observó que a los 60 días existió un aumento en la proteína con respecto a los de 20 días (Figura 12B). Esta diferencia no estuvo presente en los animales estrés (Figura 13C y E) debido a que a los 20 días los corazones estrés presentaron un aumento tanto en la cuantificación del ARN mensajero (Figura 13A) como en la proteína (Figura 13C) de los receptores β_1 -adrenérgicos con respecto a las crías controles. A los 4 días no se detectó la banda correspondiente a la proteína de estos receptores.

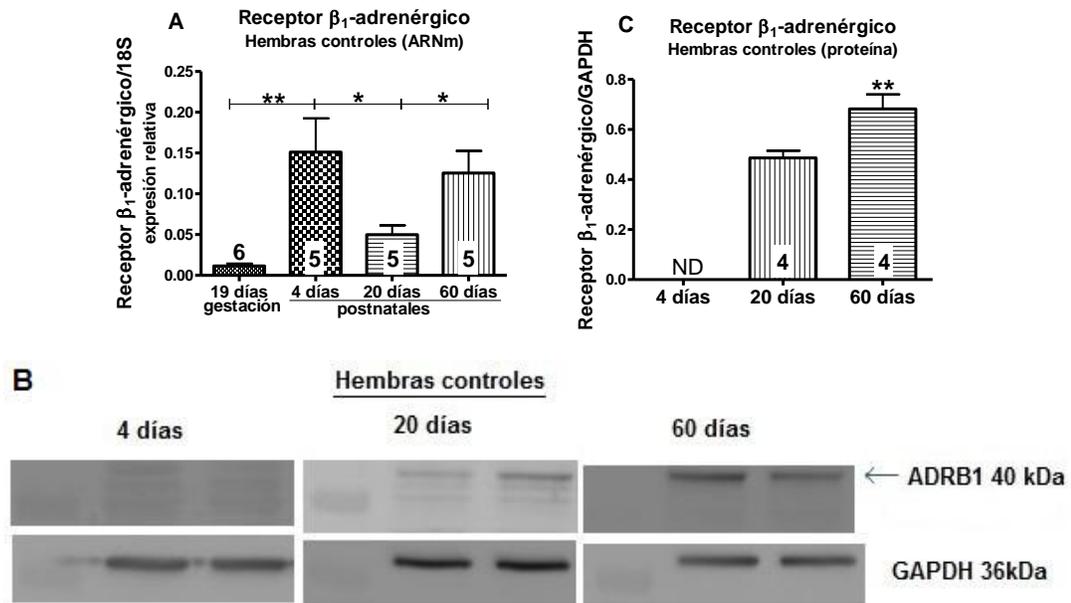


Figura 12: **Receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos en corazones de crías hembras controles.** **A.-** Cuantificación de ARN mensajero a través de qPCR de los receptores β_1 -adrenérgicos en corazones de crías hembras controles en etapa prenatal y postnatal. **B.-** Membrana representativa de los *western blot* realizados y **C.-** cuantificación de la proteína de los receptores β_1 -adrenérgicos obtenidos a través de *western blot* en corazones de crías hembras controles de 4, 20 y 60 días. Cada muestra fue realizada en triplicado y corresponden al promedio \pm error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. ND: No Detectado

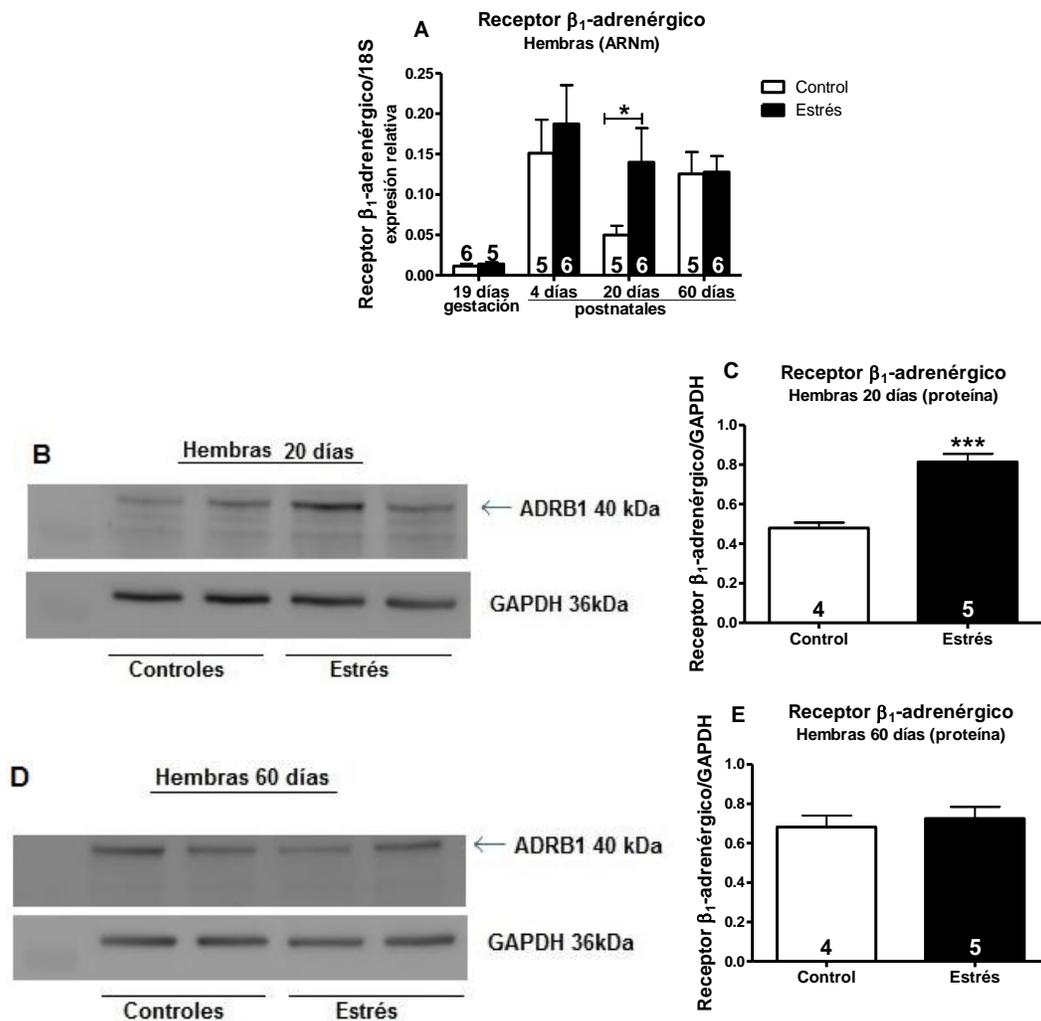


Figura 13: **Receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos en corazones de crías hembras controles y estrés.** **A.-** Cuantificación de ARN mensajero a través de qPCR de los receptores β_1 -adrenérgicos en corazones de crías hembras controles y estrés en etapa prenatal y postnatal. Membrana representativa del *western blot* realizado en corazones de crías hembras controles y estrés de **B.-** 20 días y **D.-** 60 días. Cuantificación de la proteína de los receptores β_1 -adrenérgicos obtenidos a través de *western blot* en corazones de crías hembras controles y estrés de **C.-** 20 días y **E.-** 60 días. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes y corresponden al promedio \pm error estándar medio. En **A.-** se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls, en **C** y **E** se utilizó un análisis de t-student. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

b) Receptores β_2 -adrenérgicos

Al analizar los niveles de ARN mensajero de los receptores β_2 -adrenérgicos en los corazones de las crías hembras controles (Figura 14A), se observó un aumento en el transcrito a los 4 días postnatales, para luego observar una tendencia a la disminución a los 20 días, algo que se vuelve significativo a los 60 días. No se encontraron diferencias en las crías estrés (Figura 14B).

Al analizar la proteína de los receptores β_2 -adrenérgicos cardíacos a través de *western blot*, se obtuvieron tres bandas: 65, 85 y 120 kDa (Figura 15A). Esta proteína tiene dos sitios de glicosilación, la proteína como monómero pesa 43 kDa, con un sitio glicosilado pesa 56 kDa y la proteína madura con dos glicosilaciones pesa 67 kDa. Junto a esto, se pueden encontrar como dímeros u oligómeros, pero estos últimos son sensibles al β -mercaptoetanol, frente al cual se disocian. Por lo tanto en un *western blot* podemos encontrar dímeros pero no oligómeros [59-62]. Por lo que la banda de 65 kDa correspondería a la proteína madura doblemente glicosilada, la de 85 kDa a la proteína inmadura de 43 kDa dimerizada y la banda de 120 kDa indicaría una dimerización de la proteína madura de 65 kDa. Puesto que la proteína activa es la de 65 kDa se cuantificó solamente esta banda. Se encontró una disminución de la proteína a los 20 días con respecto a los 4 días, para luego volver a aumentar a los 60 días. No se encontraron diferencias en las crías estrés (Figura 15B).

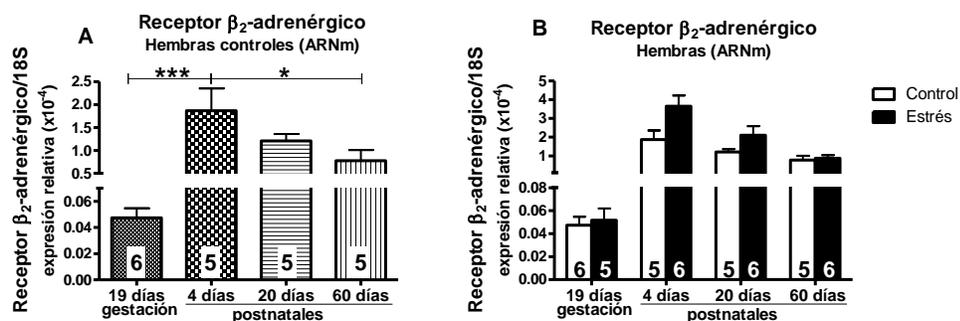


Figura 14: **Receptores β_2 -adrenérgicos cardíacos en corazones de crías hembras a través de qPCR.** A.- Cuantificación de ARN mensajero a través de qPCR de los receptores β_2 -adrenérgicos en corazones de crías hembras controles en etapa prenatal y postnatal. B.- Cuantificación de ARN mensajero a través de qPCR de los receptores β_2 -adrenérgicos en corazones de crías hembras controles y estrés en etapa prenatal y postnatal. Cada muestra fue realizada en triplicado y corresponden al promedio \pm error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

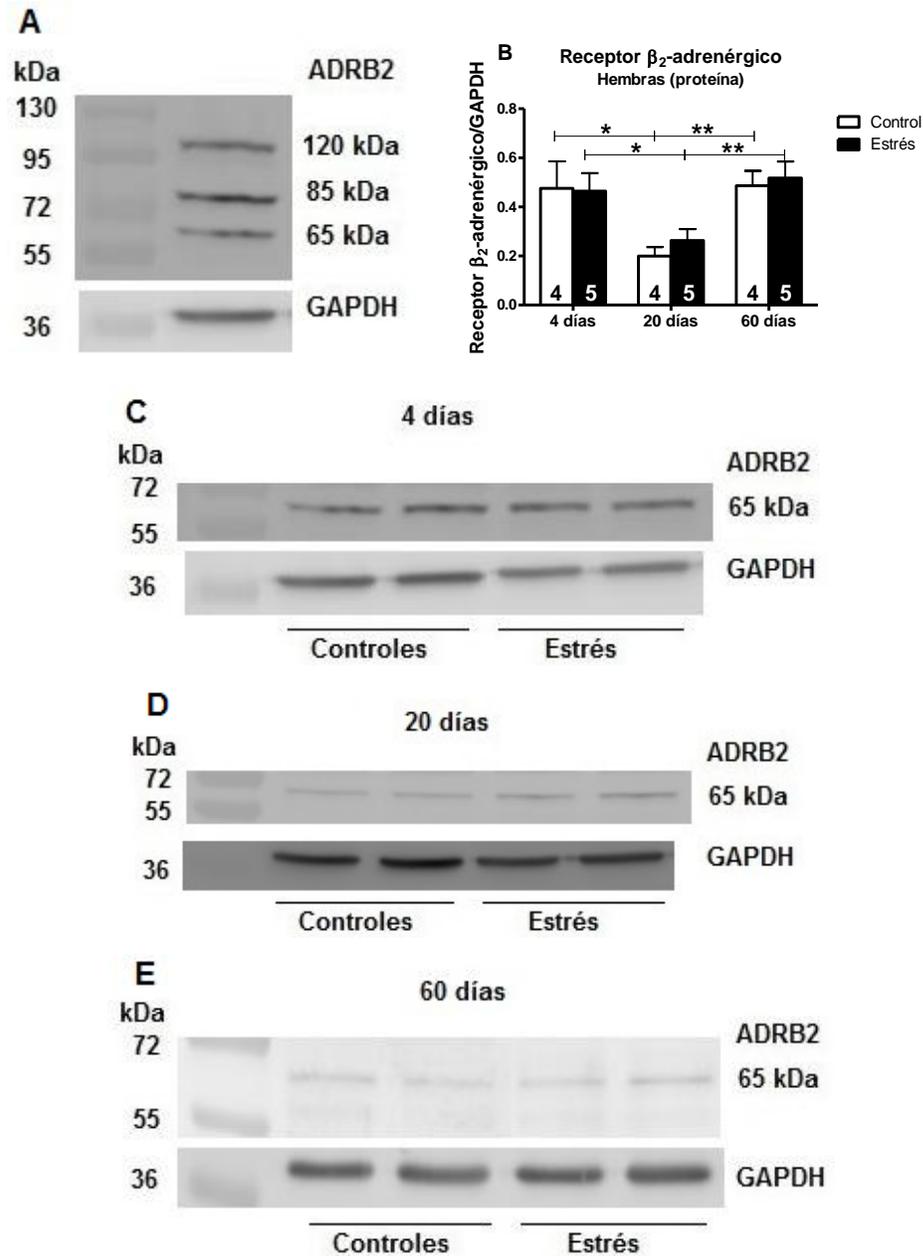


Figura 15: **Receptores β_2 -adrenérgicos cardíacos en corazones de crías hembras a través de western blot.** **A.-** Membrana representativa de las tres bandas (120 kDa, 85 kDa y 65 kDa) obtenida a través de *western blot* de los receptores β_2 -adrenérgicos en corazones de crías hembras. **B.-** Cuantificación de la banda de 65 kDa de los receptores β_2 -adrenérgicos en corazones de crías hembras controles y estrés de 4, 20 y 60 días. Membranas representativas de la banda de 65 kDa obtenidas en corazones de crías hembras de **C.-** 4 días, **D.-** 20 días y **E.-** 60 días. Los resultados fueron obtenidos de dos experimentos independientes y corresponden al promedio \pm error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. Se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en el gráfico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

c) Razón receptores β_1/β_2 -adrenérgicos

Luego de analizarse la concentración de los receptores β_1 -adrenérgicos (Figura 13) y de los receptores β_2 -adrenérgicos (Figura 15), se determinó la razón de los receptores β_1/β_2 -adrenérgicos para analizar la posibilidad de que se presentaran cambios en la proporción de estos receptores. Se observó un aumento en la razón de los receptores β_1/β_2 -adrenérgicos en las crías hembras estrés de 20 días en comparación con las controles, sin encontrar diferencias en las crías de 60 días. Además, se observó una disminución en la razón de los receptores β_1/β_2 -adrenérgicos en las crías hembras estrés de 60 días en comparación con las estrés de 20 días.

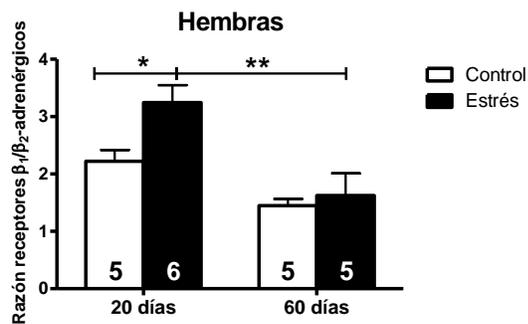


Figura 16: **Razón receptores β_1/β_2 -adrenérgicos en los corazones** de las crías hembras controles y estrés de 20 y 60 días. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. Se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en el gráfico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Objetivo específico 3.- Determinar *in vivo* el efecto del estrés por frío sobre la presión arterial y el desarrollo de hipertrofia cardíaca en condiciones basales y frente a una sobrecarga adrenérgica en las crías hembras adultas.

E) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre la respuesta cardíaca frente a una sobrecarga adrenérgica crónica en ratas hembras

En este trabajo se determinó que a los 20 días postnatales las crías hembras estrés poseen un aumento en los niveles de la proteína de los receptores β_1 -adrenérgicos (Figura 13), algo que podría estar demostrando cambios producidos a nivel cardíaco en estos animales. Para observar el efecto funcional de esto, se realizó un protocolo de inyección subcutánea diaria de 125 μ g de ISO/kg de peso durante 10 días, imitando así una sobrecarga adrenérgica crónica en las ratas hembras.

Se realizaron implantaciones de un telémetro en la arteria aorta abdominal de ratas hembras, tanto estrés como controles, manteniendo el telémetro fijado en el interior a la pared abdominal de los animales. Se les administró diariamente ISO y se les realizó la medición diaria de presión arterial y frecuencia cardíaca. Lamentablemente, luego de ser utilizado el telémetro en el cuarto animal éste dejó de funcionar por lo que no pudimos completar esta parte del objetivo, sin embargo logramos obtener determinaciones valiosas en los animales utilizados.

En las imágenes presentadas a continuación se observaron ejemplos de los resultados obtenidos. La línea roja representa la curva de presión (en mmHg) obtenida a través del telémetro y la curva azul representa el número de latidos por minuto (BPM), algo que el programa obtiene a través de la curva de presión. La Figura 17 es un ejemplo del registro de presión arterial (PA) y de BPM obtenidos en una rata hembra en condiciones controles y sin inyecciones de ISO. En la Figura 18 se observó el aumento drástico en las BPM, pasando de 460 a 540 en menos de un segundo luego de una inyección de ISO. En la Figura 19 se observaron tres ejemplos de extrasístoles, los cuales estaban presentes en las ratas estrés antes de las inyecciones de ISO y aumentaron en frecuencia luego de las inyecciones. Y finalmente, en la Figura 20 se observó la muerte de una rata hembra estrés luego de la primera administración de ISO subcutánea.

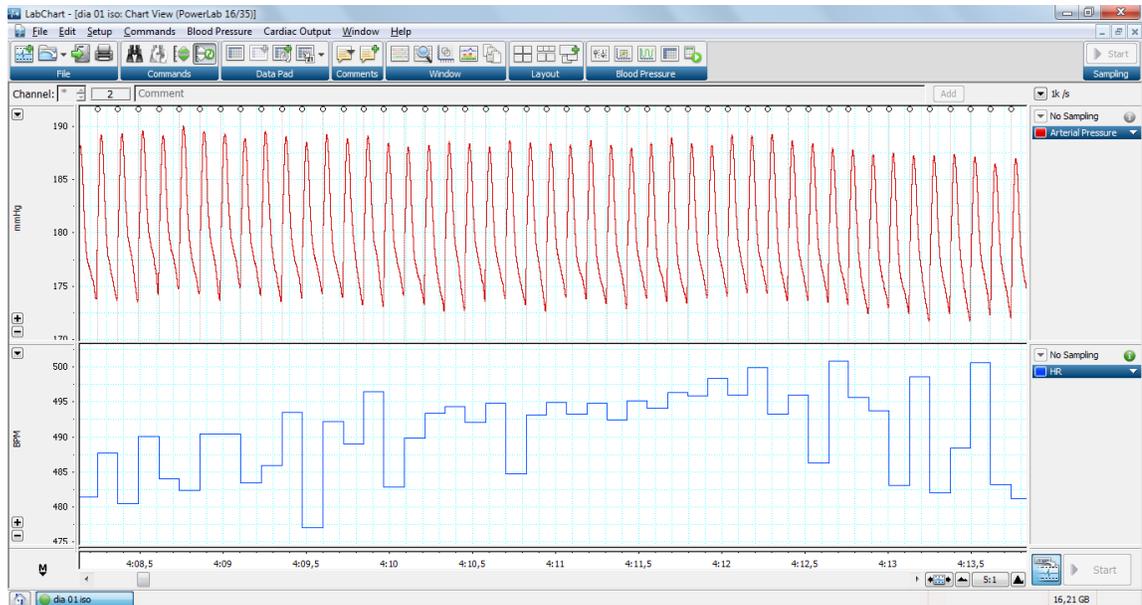


Figura 17: Registro de la PA y de los BPM en una rata hembra control sin inyecciones de ISO.

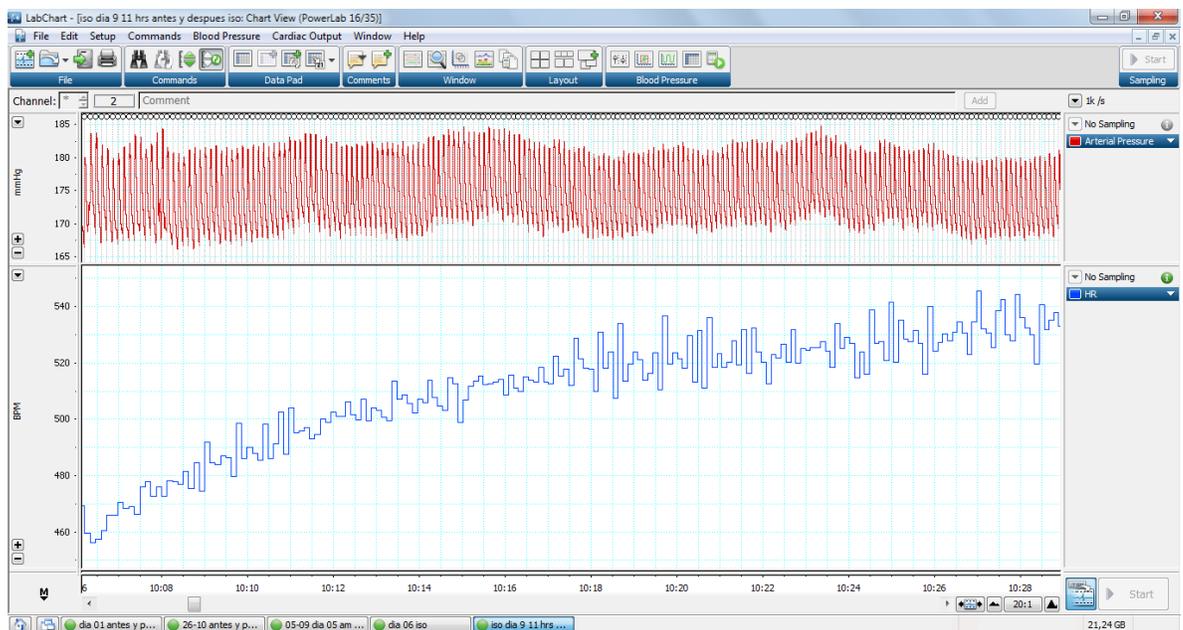


Figura 18: Registro de la PA y de los BPM en una rata hembra control luego de la administración de ISO.

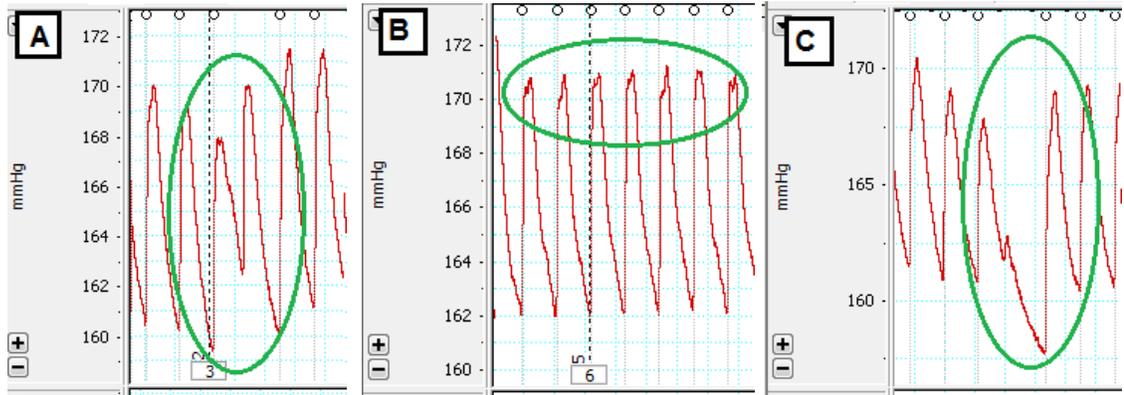


Figura 19: Registro de la PA en una rata hembra estrés. Se muestran tres ejemplos de extrasístoles que se observan frecuentemente en las ratas hembras estrés luego de las inyecciones de ISO.

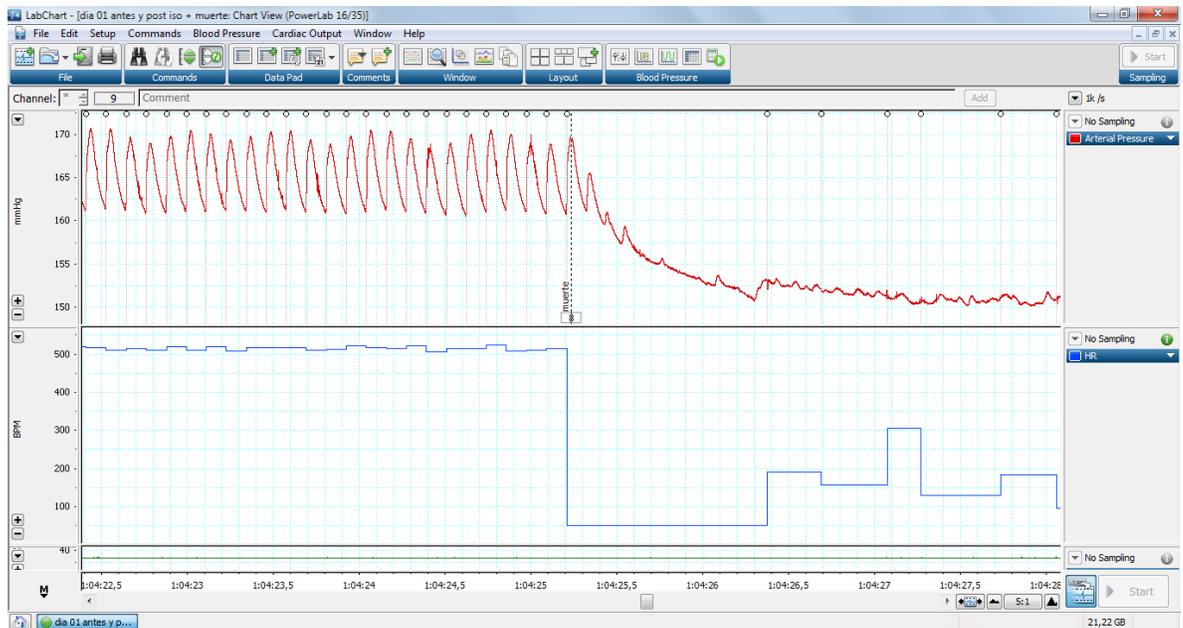


Figura 20: Registro de la PA y de los BPM durante la muerte de una rata hembra estrés luego de la primera administración de ISO.

Se observó que todas las crías hembras controles no presentaron mayores cambios fisiológicos después de los 10 días de tratamiento, sin embargo las crías hembras estrés no fueron capaces de compensar los efectos del ISO, causando la muerte en el 40% de los casos, observando los decesos solo en los primeros tres días de tratamiento (Figura 21).

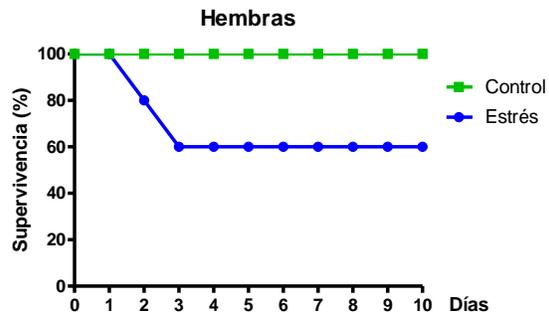


Figura 21: **Porcentaje de supervivencia de las crías hembras.** Porcentaje de supervivencia de seis crías hembras controles y cinco crías estrés frente a una sobrecarga adrenérgica realizada a través de una administración diaria de ISO a una dosis de 125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso durante 10 días.

F) Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los cardiomiocitos frente a una sobrecarga adrenérgica crónica en ratas hembras

Se determinaron las áreas y los perímetros de los cardiomiocitos de las crías hembras adultas controles, estrés, control ISO (las cuales recibieron una inyección diaria de ISO durante 10 días) y estrés ISO. Se cuantificaron 100 células por corazón y se seleccionaron exclusivamente las células a las que se les observaba claramente el núcleo y la forma de la célula (flechas amarillas en la Figura 22). Se observó que las hembras estrés presentaron un aumento tanto en los perímetros como en las áreas de los cardiomiocitos en comparación con las hembras controles. Además, se observó que el tratamiento con ISO produjo un aumento en ambos parámetros, algo que ocurrió en menor medida en las hembras estrés ISO (Figura 23).

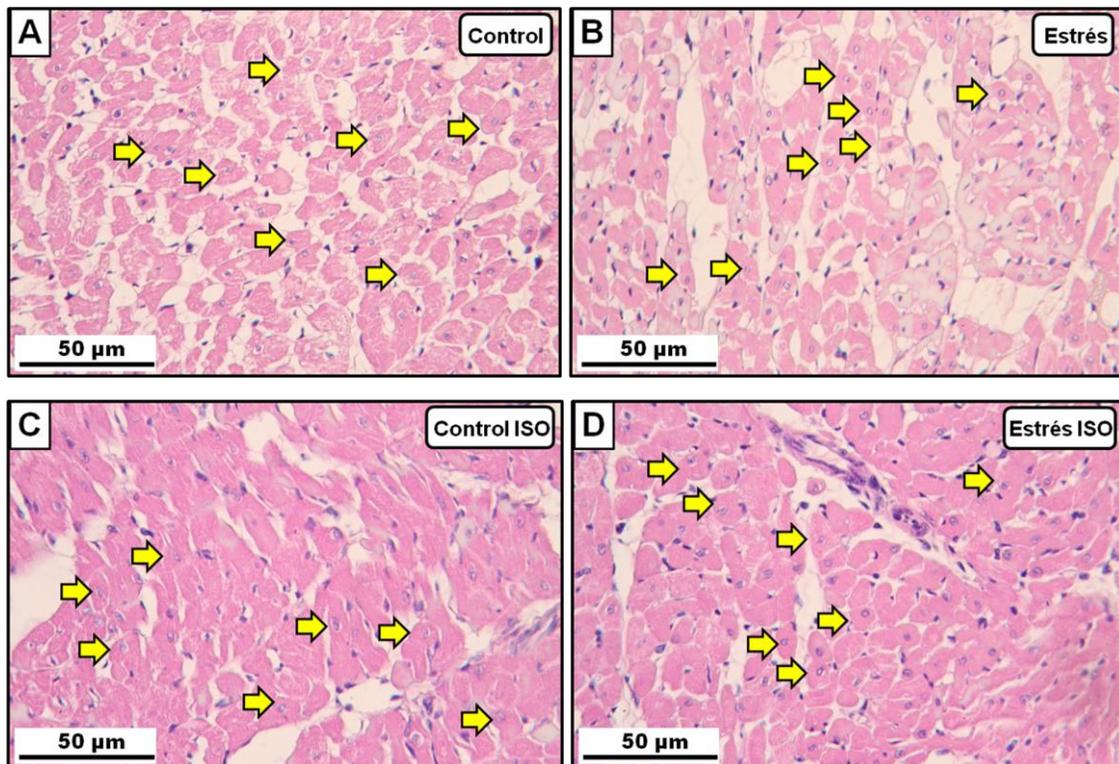


Figura 22: Fotos representativas de cortes de corazón teñidos con hematoxilina-eosina. Las flechas amarillas muestran ejemplos de los cardiomiocitos que fueron cuantificados en los corazones de las crías hembras A.- controles, B.- estrés, C.- control ISO y D.- estrés ISO.

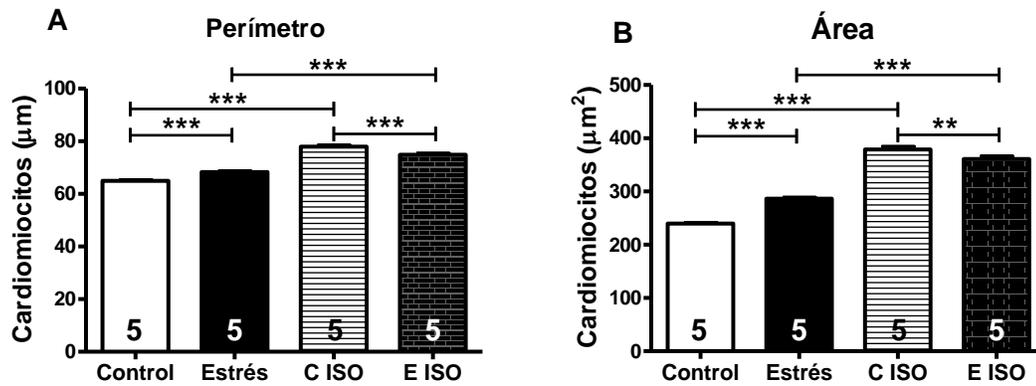


Figura 23: **Área y perímetro de cardiomiocitos de crías hembras** controles, estrés, control ISO y estrés ISO. Cuantificación del **A.-** perímetro y **B.-** áreas de los cardiomiocitos. Los resultados fueron obtenidos cuantificando 100 células por corazón y corresponden al promedio \pm error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en cada gráfico. C ISO: Control ISO; E ISO: Estrés ISO. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Los cortes de corazón fueron teñidos con Tricromo-Masson para observar las fibras de colágeno de color azul verdoso (flechas amarillas en la Figura 24). Se realizó la cuantificación del porcentaje de colágeno presente en los corazones, sin encontrar diferencias entre las crías hembras de los distintos grupos (Figura 25).

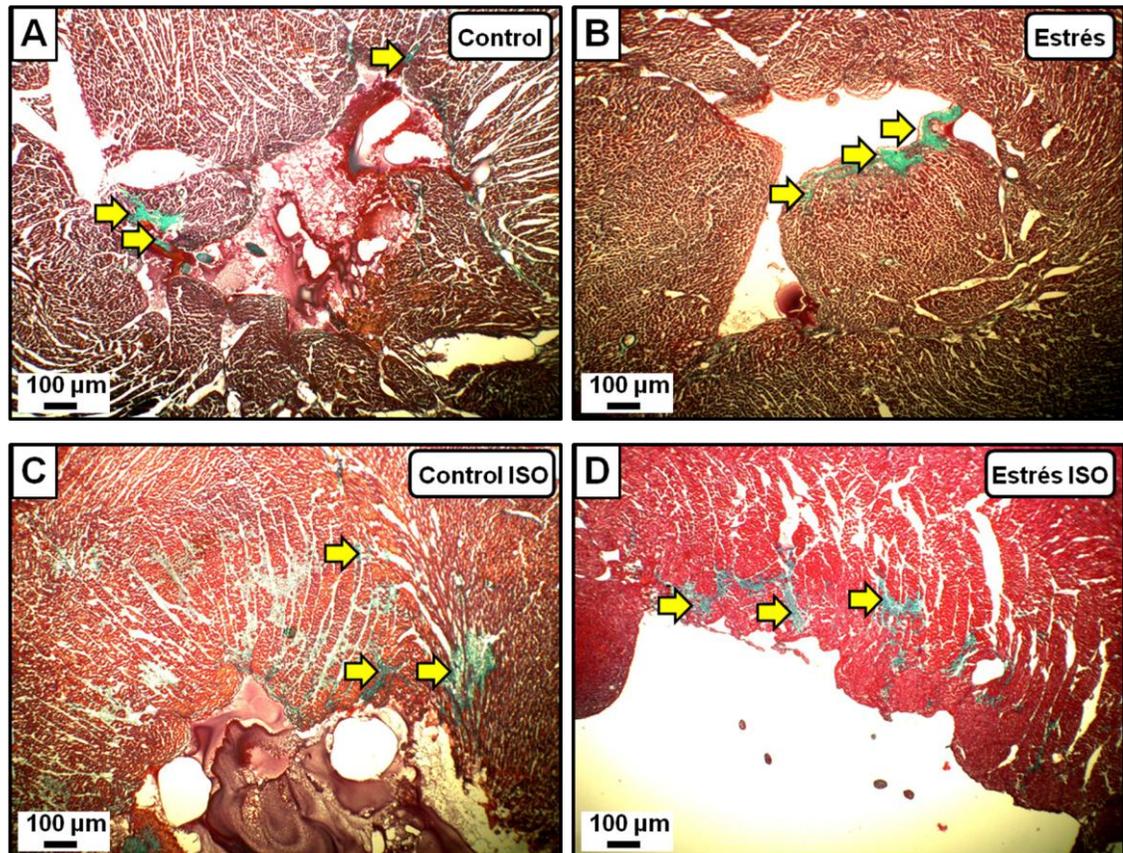


Figura 24: Fotos representativas de cortes de corazón teñidos con tricromo-masson. Las flechas amarillas muestran ejemplos de las fibras de colágeno (color azul verdoso) que fueron cuantificadas en los corazones de las crías hembras **A.-** controles, **B.-** estrés, **C.-** control ISO y **D.-** estrés ISO.

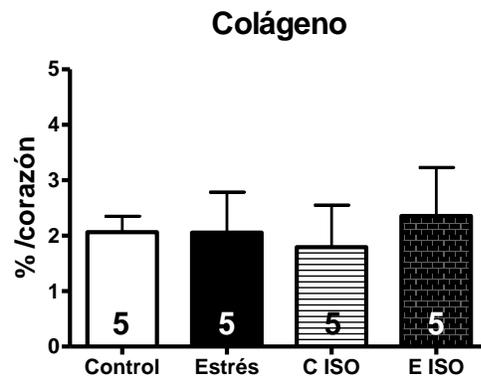


Figura 25: **Cuantificación del porcentaje de colágeno en corazones de crías hembras** controles, estrés, control ISO y estrés ISO. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. Se utilizó un análisis de ANOVA de una vía con un post test de Newman-Keuls. El número de animales se encuentra indicado en el gráfico. C ISO: Control ISO; E ISO: Estrés ISO.

Objetivo específico 4.- Determinar el efecto del estrés por frío sobre la respuesta glicémica e insulínica frente a una sobrecarga de glucosa en las crías hembras adultas.

G) Efecto del estrés durante la gestación sobre la respuesta glicémica e insulínica frente a una sobrecarga de glucosa en las crías hembras adultas.

a) Concentración de glucosa

Para determinar el posible efecto del estrés por frío prenatal sobre la respuesta frente a una sobrecarga de glucosa, se determinaron las concentraciones de glucosa en sangre en las crías hembras adultas controles y estrés luego de una administración oral de 2 g de glucosa/kg de peso de una solución al 40%. Se observó que la curva correspondiente a las hembras estrés (azul) se encuentra por sobre la curva de las hembras controles (verde), encontrando un aumento en el área bajo la curva de la curva estrés. Se encontró un aumento en las concentraciones de glucosa en sangre a los 60 y 90 minutos luego de la administración de glucosa oral en las hembras estrés.

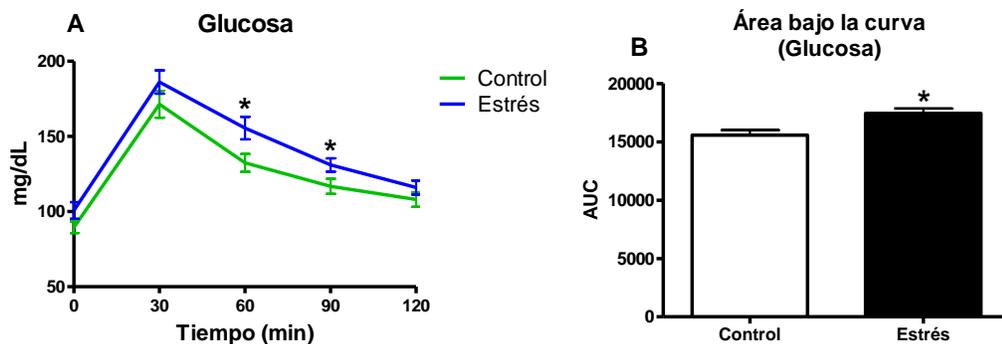


Figura 26: **Concentración de glucosa en sangre** luego de una sobrecarga de glucosa en crías hembras controles y estrés. **A.-** Determinación de las concentraciones de glucosa en muestras de sangre obtenidas por corte de cola luego de una administración oral de 2g de glucosa/kg de peso a los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 minutos en trece ratas hembras controles y doce ratas hembras estrés. **B.-** Área bajo la curva de la curva de glucosa en ratas hembras controles y estrés. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. Se utilizó un análisis de t-student. * $p < 0,05$.

b) Concentración de insulina

Además de la determinación de glucosa realizada, se determinaron las concentraciones de insulina en sangre en las crías hembras adultas controles y estrés luego de una sobrecarga de glucosa oral. Se observó que, al igual que en las concentraciones de glucosa anteriores (Figura 26), la curva correspondiente a las hembras estrés (azul) se encuentra por sobre la curva de las hembras controles (verde) hasta los 90 minutos luego de la administración de glucosa, encontrando una mayor área bajo la curva en las hembras estrés. Además, se encontró un aumento en las concentraciones de insulina basales en sangre previo a la administración de glucosa oral (a tiempo 0).

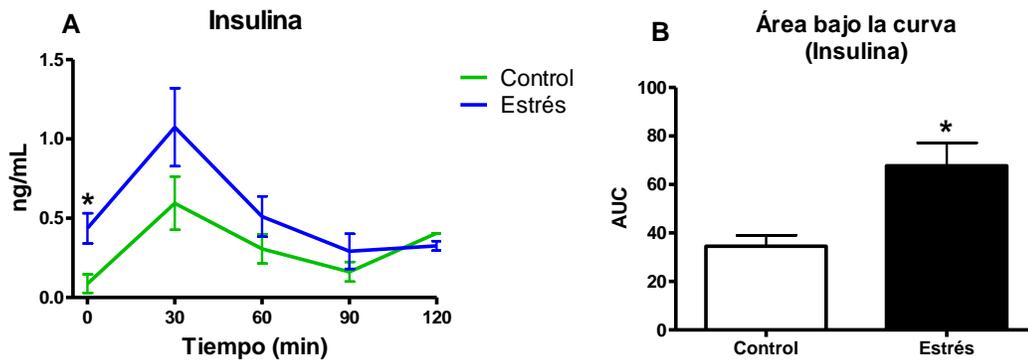


Figura 27: **Concentración de insulina en sangre** luego de una sobrecarga de glucosa en crías hembras controles y estrés. **A.-** Determinación de las concentraciones de insulina en muestras de sangre obtenidas por corte de cola luego de una administración oral de 2g de glucosa/kg de peso a los tiempos 0, 30, 60, 90 y 120 minutos en cuatro ratas hembras controles y tres ratas hembras estrés. **B.-** Área bajo la curva de las curvas de insulina en ratas hembras controles y estrés. Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. Se utilizó un análisis de t-student. * $p < 0,05$.

c) Índice HOMA

El índice HOMA se utilizó para determinar presencia de resistencia a la insulina (RI), considerando RI cuando el índice daba mayor a 2,5 [50-52]. Se observó presencia de RI en las ratas estrés.

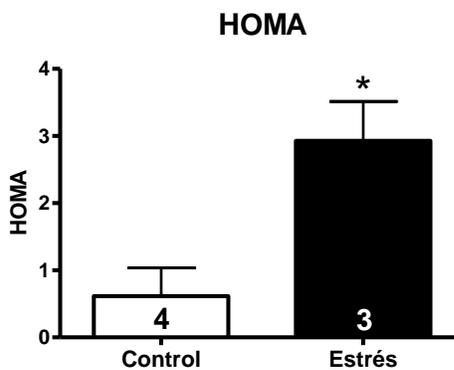


Figura 28: **Índice HOMA en crías hembras controles y estrés.** Los resultados corresponden al promedio \pm error estándar medio. El número de animales se encuentra indicado en el gráfico. Se utilizó un análisis de t-student. * $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

El protocolo de estrés por frío utilizado en este trabajo es un protocolo que ha sido clasificado como un protocolo de estrés simpático. Esto puesto que activa exclusivamente al SNS produciendo la consiguiente liberación de NA sin producir cambios en las concentraciones de ACTH ni de A, lo cual indica la no participación del eje hipotálamo-pituitaria-adrenal [4-5, 18]. Debido a esto, que los efectos encontrados en este trabajo fueron atribuidos a la sobre exposición de los fetos a las concentraciones aumentadas de NA.

a) Etapa prenatal

En nuestro laboratorio se ha utilizado este protocolo de estrés crónico por 3, 4 y 8 semanas para estudiar el impacto de esta estimulación sobre la función ovárica en ratas adultas [19, 58-59]. También se ha utilizado este protocolo en ratas preñadas para estudiar el impacto en la función ovárica de la descendencia [63], sin embargo, hasta la fecha, no había sido estudiado el efecto en los animales gestantes.

Uno de los principales objetivos de este trabajo fue determinar si el estrés por frío genera una modificación en las concentraciones de NA plasmáticas en ratas preñadas y relacionar estos cambios con la expresión de los NET placentarios, para de esta forma obtener información sobre mecanismo putativo que explique los efectos deletéreos encontrados previamente en la función reproductiva de la descendencia [63].

Efectos de la preñez y del estrés crónico durante la gestación sobre las concentraciones de NA y de corticosterona plasmática

Efectivamente encontramos que el estrés por frío crónico aumentó los niveles plasmáticos de NA en las madres gestantes de 19 días de gestación.

Los niveles obtenidos de NA en las ratas controles no gestantes fueron consistentes con los encontrados en la literatura, para animales sacrificados mediante decapitación, lo cual aumenta en 10-20 veces los niveles de NA en comparación con los valores fisiológicos normales [64-65]. Además, se observó en ratas controles gestantes una disminución en las concentraciones de NA en comparación tanto con las

ratas no gestantes como con el avance de la gestación, algo que también se ha observado en la literatura [66-67].

El aumento encontrado en las concentraciones de corticosterona plasmática en las ratas estrés, tanto a los 15 como a los 19 días de gestación, nos indicaría una activación del eje HPA, algo que no se observa en animales no gestantes sometidos a este mismo protocolo de estrés [19].

El aumento de corticosterona al término de la gestación es una observación general que se ha descrito tanto en ratas [68] como en mujeres embarazadas [69], indicando que es una respuesta general de preparación al parto y lactancia. Esto se correlaciona con la disminución encontrada en los niveles de NA plasmáticos puesto que se ha visto que los glucocorticoides disminuyen la proteólisis de feniletanolamina n-metiltransferasa (PNMT; enzima que metila la NA transformándola en A), produciendo una mayor acción de ella, aumentando así la síntesis de A con la concomitante disminución en NA [70]. Junto con esto, también se observó que los niveles de corticosterona en suero durante la gestación en animales controles son consistentes con los encontrados en la literatura [71-72], al igual que los niveles encontrados en ratas no gestantes sacrificadas por decapitación sin anestesia y que tuvieron una manipulación larga [73-74].

Un aumento en las concentraciones de corticosterona durante la gestación podría llegar a generar efectos deletéreos en la descendencia, al ser un esteroide lipofílico puede cruzar fácilmente la placenta, la cual además posee receptores de glucocorticoides y llegar así al feto. En condiciones normales, los niveles de glucocorticoides fetales son mucho menores que los encontrados en el plasma materno, esto es algo que se debe a la presencia de una enzima llamada 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2, la cual inactiva la corticosterona pasándola a 11-dehidroxicorticosterona, protegiendo así a los fetos de los efectos deletéreos de los glucocorticoides maternos [34]. En placentas de pacientes con insuficiencia placentaria, por ejemplo con restricción de crecimiento intrauterino, se ha observado que presentan una disminución en la actividad de esta enzima, encontrando hipercortisolemia en la circulación fetal [75-76], esto es algo que también se ha observado en modelos de rata con insuficiencia placentaria [35, 77]. Junto con esto, se ha observado en humanos, una relación directa entre los aumentos en las

concentraciones de cortisol en la circulación fetal y el desarrollo de ciertas enfermedades en la adultez, tales como hipertensión arterial y diabetes tipo 2 [78]. Por lo que quedaría estudiar a futuro, qué estaría sucediendo con esta enzima en los animales estrés utilizados en este trabajo para así determinar si la presencia de niveles elevados de corticosterona en el plasma materno podría estar produciendo aumentos en los niveles de corticosterona en la circulación fetal.

Efectos del estrés crónico durante la gestación sobre el número, el peso de las crías y sus placentas

Se encontró un aumento en el peso de las crías estrés y de sus placentas durante la etapa prenatal, sin observarse diferencias en el número de crías totales, la relación entre crías hembras o machos obtenidos por camadas, ni en la duración del periodo de gestación de estos animales.

Como ya se demostró anteriormente, nuestro protocolo de estrés estaría activando el SNS, produciendo un aumento en la liberación de NA, la cual activaría los receptores adrenérgicos produciendo una respuesta simpaticomimética, conocida también como “respuesta de pelea o huida”. Esto produce diversos efectos, tales como aumentar el *output* cardíaco (ionotropismo y cronotropismo), dilatación de la pupila, aumento de la lipólisis en adipocitos, gluconeogénesis en hígado, entre otras. Por lo tanto, el aumento encontrado en NA podría estar generando un aumento en los niveles de glucosa maternos y esto podría estar afectando el desarrollo de los fetos.

Se ha observado en mujeres con diabetes gestacional que la hiperglicemia que padecen estaría induciendo una hiperglicemia fetal, la cual estimula el páncreas fetal, resultando en una hipertrofia e hiperplasia de las células de los islotes β -pancreáticos aumentando el contenido y la secreción de insulina, y así, una hiperinsulinemia fetal. A su vez, la insulina actúa como una hormona anabólica primaria del crecimiento y desarrollo fetal generando una macrosomía fetal [79]. Esto es algo que también se ha observado en modelos de hiperglicemia gestacional en ratas [80] y por ende, el aumento observado en las concentraciones de NA podrían estar generando un aumento en los niveles de glucosa maternos, los que estarían aumentando la glicemia fetal, lo que produciría una hiperinsulinemia fetal y esto podría estar produciendo un

aumento en el peso de las crías y en el peso de las placentas encontrados en este trabajo.

Efectos del estrés crónico gestacional por frío sobre los NET placentarios

Durante el embarazo, la placenta juega un rol esencial en mantener bajas las concentraciones de monoaminas en la circulación uteroplacental, esto a través de la expresión de transportadores que captan monoaminas específicas en el plasma y en el líquido amniótico. Entre ellos encontramos a los NET placentarios, los cuales son los encargados de mantener el *clearance* de NA tanto de la circulación materna como fetal [55].

Nuestro protocolo de estrés generó un aumento en las concentraciones de NA plasmáticas maternas. Este resultado se correlacionó con la capacidad de la placenta para transportar $^3\text{H-NA}$, lo cual nos indicó la capacidad de estos transportadores para generar una respuesta funcional. La incorporación de NA en presencia de cocaína, la cual es un inhibidor específico de la recaptación de monoaminas [54], da cuenta de la funcionalidad específica de los NET placentarios para la recaptación de NA, descartando así la posibilidad de que ésta esté siendo recaptada por algún otro transportador no específico. Se observó una disminución en la incorporación de $^3\text{H-NA}$ en placentas de crías estrés a los 19 días de gestación. Esto podría deberse a una disminución en la funcionalidad de los NET placentarios o bien a una disminución en la cantidad de proteína de este transportador presente en las membranas plasmáticas.

Para dilucidar el motivo de la disminución de incorporación, se realizó un *western blot* para ver así la cantidad de proteína de NET en las placentas, tanto de crías hembras controles como de crías hembras estrés. Se obtuvieron tres bandas de 80, 55 y 46 kDa que corresponden a la proteína con distintos grados de glicosilación dependiendo de su nivel de madurez [43, 56]. La proteína de 80 kDa es el NET completamente glicosilado y por lo tanto maduro y funcional, el cual se encuentra a nivel de membrana plasmática. La de 55kDa y 46 kDa están medianamente glicosilada y sin glicosilaciones respectivamente, debido a lo cual no son funcionales [43, 56], por lo que solo se muestran los resultados de la proteína funcional de 80 kDa, la cual se observó aumentada en las placentas de las crías estrés. Por lo tanto, la disminución en la incorporación de $^3\text{H-NA}$ en las placentas estrés se estaría debiendo a una

disminución en la funcionalidad de estos transportadores y este aumento en la proteína sería un mecanismo compensatorio frente a la menor capacidad de incorporación de los NET placentarios.

El NET pertenece a la familia de los transportadores dependientes de Na^+/Cl^- . La energía electroquímica derivada del gradiente de Na^+ es lo que permite la acumulación intracelular de la NA [44], por lo que indirectamente es un transportador dependiente de la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, la cual regula el gradiente de Na^+ de las células. Se ha observado que en casos de insuficiencia placentaria, como en casos de pacientes con preeclampsia y en ratas con una patología similar, se produce un aumento en la cantidad de marinobufagenin, el cual es un esteroide cardiotónico vasoconstrictor que inhibe a la bomba de Na^+/K^+ ATPasa, causando una menor funcionalidad en los NET placentarios puesto que no cuentan con el gradiente de Na^+ del cual dependen [81-82]. Este mecanismo podría ser el causante de la disminución en la funcionalidad de los NET en las placentas de las ratas estrés.

Efectos del estrés crónico gestacional por frío en la etapa prenatal

Considerando todos los resultados expuestos, observamos que los 15 días de gestación es una etapa muy temprana de la preñez por lo que aún no se observan cambios debido al protocolo de estrés. Sin embargo esto cambia a los 19 días de gestación, edad a la cual existe un aumento de NA plasmática, acompañado de una disminución en la incorporación de NA debido a una disminución en la funcionalidad de los NET placentarios, algo que estaría causando un aumento en la cantidad de proteína del NET como mecanismo compensatorio. Este aumento no conseguiría equiparar la disminución en la funcionalidad de los transportadores, por lo que los fetos se podrían estar desarrollando en condiciones de mayores concentraciones de NA en la sangre fetal. Esto es algo que ya se ha observado en mujeres con preeclampsia en donde se presenta una disminución en la expresión del NET placentario [45] y también se ha visto en ovejas, a las cuales se les administró catecolaminas a las ovejas gestantes y se observó que, a corto plazo el sistema de transportadores placentarios es eficiente para proteger al feto del paso aumentado de catecolaminas maternas, pero que a largo plazo se traduce en un aumento en la concentración de catecolaminas en la sangre fetal [46]. Estas observaciones sugieren fuertemente que situaciones de

estrés crónico podrían tener efectos en los fetos y programar varias funciones del gestante que se expresarían durante la vida adulta.

b) Etapa postnatal

Durante el periodo de gestación, los fetos responden mediante diversas adaptaciones a la información entregada por la madre durante el embarazo puesto que esta información es utilizada como una predicción del medio postnatal en el que estos nuevos organismos se van a desarrollar. Además permite cambios en una sola generación, por lo que se vuelve una adaptación mucho más rápida que la adaptación genética [3, 9-10, 83-84] y puede generar cambios epigenéticos permanentes en tejidos, fisiología y metabolismo, lo que podría producir una predisposición a padecer enfermedades cardiovasculares, metabólicas y endocrinas en la etapa adulta [8, 11].

Se han realizado diversos estudios en animales, los cuales han demostrado que periodos muy cortos de tiempo de restricción o de exceso de nutrientes, en cualquier estadio del desarrollo fetal, pueden generar efectos deletéreos en la salud del animal a largo plazo [85], llegando a considerarse la variación en el suministro de nutrientes durante el periodo de gestación como uno de los principales estímulos de programación que determinaría el riesgo de enfermedades en la adultez [12]. Por ejemplo, se ha estudiado en ratas Wistar que la restricción proteica materna durante el periodo de gestación y la lactancia produce un aumento en los niveles de fibrosis cardíaca [86], además de observar una menor concentración de receptores β_1 -adrenérgicos cardíacos, un ritmo cardíaco basal reducido en comparación al grupo control y menores niveles del receptor de insulina. Por otro lado, frente a una nueva estimulación β -adrenérgica (a través del uso del agonista ISO) se demoran más en volver al ritmo cardíaco basal, sugiriendo que la exposición prenatal a una restricción proteica en la dieta de la madre se encuentra directamente relacionada con el aumento en las enfermedades cardíacas [87].

En este trabajo también encontramos que el protocolo de estrés por frío generó un aumento en las concentraciones de NA junto con una disminución en la funcionalidad de los NET placentarios, algo que podría estar generando que los fetos se desarrollen en concentraciones aumentadas de NA en la circulación fetal, tal como ya se determinó en ovejas [46], produciendo una programación que podría estar afectando diversos

órganos. Debido a esto decidimos determinar qué estaría ocurriendo a nivel cardíaco con las crías hembras estrés durante el desarrollo postnatal.

Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre la alimentación y la ganancia de peso en ratas gestantes controles y estrés

En nuestro laboratorio se demostró previamente que las ratas no gestantes que fueron sometidas a un protocolo de estrés por frío durante 4 semanas aumentaban su ingesta de alimentos durante la última semana de estrés sin producir cambios en el peso de los animales [20]. Sin embargo, no se había realizado este estudio en animales gestantes.

Se observó que las ratas preñadas en condición de estrés comieron menos durante el segundo tercio de la preñez, algo que no se observó al comienzo ni al final de ella. No se encontraron cambios en el peso de la rata gestante pero sí se observó una tendencia a ganar menos peso durante el segundo tercio de la preñez, sin embargo tienen en promedio la misma ganancia de peso junto con la misma ingesta de alimento diaria que los animales controles.

Se ha observado que, si se somete a ratas a un protocolo de estrés por inmovilización repetidamente, las ratas hembras disminuyen su ingesta de alimento durante las primeras sesiones para luego aumentar la ingesta alcanzando cantidades iguales de alimento que las ratas controles, lo que estaría indicando cierta habituación al estrés por partes de estos animales [88]. Lo mismo es lo que se observó con la ingesta de alimento en la ratas gestantes que estaban siendo estresadas, por lo que podrían estarse adaptando a su situación diaria de estrés hacia el final de la preñez.

Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los días de gestación, número de crías totales, número de crías separadas por género y pesos de las crías hembras y sus corazones

Se ha observado en diversos modelos animales que la exposición prenatal a glucocorticoides produce disminución en el peso al nacer y aumento en la presión arterial cuando adultos [89]. Además se ha observado que la intensidad y el efecto del estrés serían dependientes del periodo de la gestación en el cual fue aplicado,

encontrando que el estrés aplicado entre los días 1 y 11 de gestación era más dañino para las crías que si el mismo estrés era aplicado en los días siguientes o durante todo el periodo de gestación, algo que se evidenciaba mediante la disminución en el peso y el tamaño de las crías junto con el aumento en las muertes neonatales [14].

Nuestro protocolo de estrés gestacional no produjo diferencias en el número de crías, número de hembras y machos ni en la duración de la gestación. Pero sí se encontró una diferencia en el aumento en el tamaño de las crías estrés durante el desarrollo prenatal, el cual no se mantuvo durante la etapa postnatal. Sin embargo, se observó un aumento en el peso de los corazones de las crías hembras tanto prenatal como postnatalmente. Por lo que nuestro protocolo de estrés estaría generando una programación a nivel cardíaco, del cual se observó como primer indicio el aumento del tamaño de los corazones de las crías estrés.

Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los niveles de noradrenalina plasmática y cardíaca en crías hembras

Se observó que no existen diferencias en las concentraciones de NA plasmáticas en ratas de 20 y 60 días, sin embargo se encontró que estas concentraciones aumentaron con la edad de la rata. Esto es algo que también se ha observado en humanos, en donde se ha visto que en personas sanas entre 10 y 65 años los niveles de NA aumentan junto con la edad [90].

Por otro lado, se realizó la determinación de las concentraciones de NA en los corazones de las crías hembras. No se encontraron diferencias entre animales controles y estrés, sin embargo se observó que a los 20 días existió un aumento en las concentraciones de NA cardíacas en comparación con los 4 días, y estos niveles se mantuvieron constantes a los 60 días. Las ratas no presentan inervación simpática cardíaca en el momento del nacimiento, sino que esta inervación ocurre recién alrededor de la segunda semana postnatal [91]. Por lo tanto, a los 4 días las ratas no tienen inervados simpáticamente el corazón, sin embargo esta inervación ya está presente a los 20 días lo que se traduce en un aumento exponencial de NA en el corazón.

Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre los niveles de receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos en corazones de ratas hembras

La NA es el ligando de los receptores β -adrenérgicos, se sabe que en el corazón de las ratas existen dos subtipos de receptores β -adrenérgicos: β_1 y β_2 , los cuales se encuentran en concentraciones similares en el nodo aurículo-ventricular [24]. Además, se ha estudiado en humanos que fallas cardíacas producen alteraciones en la población de receptores β -adrenérgicos en el miocardio ventricular, causando una disminución en la concentración de receptores β_1 -adrenérgicos debido a un mecanismo de *downregulation*, sin que se observen cambios en la población de receptores β_2 -adrenérgicos. Esto genera que, frente a problemas cardíacos la proporción β_1 : β_2 cambia, pasando de 77:23 en corazones sanos, a 60:38 en corazones con problemas [26]. Es debido a esto que en este trabajo se decidió estudiar qué estaría ocurriendo con estos receptores en los corazones de ratas que se desarrollaron *in utero* en un medio con concentraciones aumentadas de NA.

Para comenzar, se realizó un ensayo de radioligando en corazones de ratas hembras de 20 y 60 días, en el cual se desplazó el ^3H -DHA con Propanolol, al ser este fármaco un antagonista β -adrenérgico inespecífico nos entregó información sobre ambos subtipos de receptores β -adrenérgicos. No se encontraron diferencias en las concentraciones de estos receptores en ambas edades.

Para determinar qué estaría sucediendo con la afinidad de estos receptores, se realizó el mismo ensayo pero con concentraciones crecientes de Propanolol, de esta forma se obtuvieron las curvas de desplazamiento. Se observó que en corazones de ratas de 20 días no se encontraron diferencias en la afinidad de estos receptores. Sin embargo, se observó que a los 60 días las curvas fueron diferentes, encontrando que los corazones estrés necesitan una mayor concentración de fármaco para generar el mismo desplazamiento que los corazones controles. Esto es algo que se ratificó al extrapolar el valor de la curva correspondiente a la concentración de fármaco necesitara para generar el 50% de desplazamiento del radioligando (IC50), en donde se observó claramente que los corazones estrés de 60 días presentaron una IC50 mayor que los corazones controles de la misma edad. Este aumento en la IC50 estaría indicando una menor afinidad de los fármacos por los receptores β -adrenérgicos.

Por lo tanto, los corazones de las crías estrés de 60 días presentan la misma concentración de receptores β -adrenérgicos que las crías controles pero con una disminución en la afinidad por su ligando. Estos cambios en la afinidad, tienen un significado funcional similar a los encontrados en infartos al miocardio, en los cuales existe una disminución en la concentración de receptores β_1 -adrenérgicos sin cambios en la concentración de receptores β_2 -adrenérgicos [26]. En nuestro caso, la disminución en la afinidad implicaría que a una misma concentración de ligando se presentaría una disminución en la capacidad de respuesta contráctil en los corazones de ratas estresadas comparadas con las controles, necesitando las ratas estrés concentraciones mayores de ligando para generar un efecto similar al de las controles.

Por otro lado, al comparar solo las crías controles podemos observar que la IC50 disminuye a los 60 días con respecto de los 20 días, es decir la afinidad aumenta a los 60 días, algo que no ocurre en los corazones de las crías estrés, en donde observamos que la IC50 se mantiene constante en ambas edades. Esto nos estaría indicando que los receptores β -adrenérgicos en los corazones de las crías hembras controles de 60 días serían receptores más sensibles a los cambios en las concentraciones de NA plasmáticas.

Receptores β_1 -adrenérgicos

Se determinaron los niveles de transcrito del ARN mensajero de estos receptores en los corazones de las crías hembras controles. Se observó que su cantidad es baja pero detectable durante la etapa prenatal (19 días de gestación), luego hubo un aumento notorio en su cantidad a los 4 días postnatales, la cual disminuyó a los 20 días, y finalmente aumentó nuevamente a los 60 días.

Para determinar si estos cambios tenían relación con los niveles de proteína de estos receptores, se realizó un *western blot* en los corazones de las crías de 4, 20 y 60 días. En estos experimentos se observó que en corazones de crías hembras de 4 días no se detectó la banda correspondiente a la proteína de los receptores β_1 -adrenérgicos (40 kDa). Sin embargo, sí se observó la banda a los 20 y 60 días, encontrando que a los 60 días los corazones presentaron mayores cantidades de esta proteína que a los 20 días, algo que tiene relación con los resultados obtenidos del ARN mensajero.

Se sabe que a los 4 días los corazones de las ratas aún no se encuentran inervados por el SNS, algo que solo ocurre luego de la segunda semana postnatal, y se ha visto que a esa edad la función contráctil y la homeostasis del calcio se encuentra realizada principalmente por los receptores β_2 -adrenérgicos (los cuales luego de la maduración de la inervación simpática pierden protagonismo) [91-92]. Por lo tanto, esto podría estar explicando la ausencia de la proteína de los receptores β_1 -adrenérgicos a los 4 días. Sin embargo, a esa misma edad sí se encontró presencia del ARN mensajero, lo que nos estaría indicando que la síntesis de la proteína no estaría ocurriendo todavía pero sí se encontraría presente toda la maquinaria necesaria para realizarse una vez ocurrido la inervación simpática a nivel cardíaco. Siguiendo la misma idea, a los 20 días los corazones estarían recién inervados simpáticamente, por lo que estaría comenzando la traducción de los ARN mensajeros con el consiguiente aumento y aparición de la proteína de los receptores β_1 -adrenérgicos junto con la degradación y no acumulación de los ARN mensajeros ya traducidos. Finalmente, a los 60 días el sistema ya se encontraría en equilibrio entre la producción de ARN mensajero y proteína lo que explicaría un aumento en las cantidades de ARN mensajero en comparación a los 20 días.

Además, se encontró que debido al protocolo de estrés los corazones de las crías estrés de 20 días presentaron un aumento en la cantidad de proteína y de ARN mensajero de los receptores β_1 -adrenérgicos. Sin embargo, a los 60 días no se encontró esta diferencia, observándose la misma cantidad de proteína y de ARN mensajero en los corazones de las crías controles y estrés.

Receptores β_2 -adrenérgicos

Al determinar los niveles de transcrito para el ARN mensajero de estos receptores en los corazones de las crías hembras controles se encontró que estaba presente en bajas cantidades a los 19 días de gestación, para luego aumentar notablemente a los 4 días postnatales, para finalmente disminuir con la edad de la rata. Esto es algo que también se observó en el corazón de las crías hembras estrés.

Para determinar qué estaría sucediendo con la proteína de los receptores β_2 -adrenérgicos en los corazones de 4, 20 y 60 días se realizó un *western blot* en el que se obtuvo tres bandas: una de alrededor de 65 kDa, otra de 85 kDa y una tercera de

120 kDa. Los receptores β_2 -adrenérgicos tienen dos sitios de glicosilaciones, la proteína como monómero pesa alrededor de 43 kDa, con un sitio glicosilado pesa 56 kDa y la proteína madura con dos glicosilaciones pesa 67 kDa. Junto a esto, se pueden encontrar como dímeros u oligómeros, pero estos últimos, a diferencia de los dímeros, son sensibles al β -mercaptoetanol, frente al cual se disocian por lo que no es posible detectarlos a través de un *western blot* [59-62]. Por lo tanto, la banda de 65 kDa correspondería a la proteína madura doblemente glicosilada, la de 85 kDa podría corresponder a la proteína inmadura de 43 kDa dimerizada y la banda de 120 kDa nos indicaría una dimerización de la proteína madura de 65 kDa. Puesto que la proteína activa es la que corresponde a la banda de 65 kDa solo esta última fue cuantificada.

Se observó que en crías hembras, los niveles de la proteína madura de este receptor disminuyeron a los 20 días con respecto a los 4 días para luego volver a aumentar a los 60 días. Sin embargo, no observamos diferencias entre las crías controles y estrés.

La disminución en los niveles de ARN mensajero y de proteína madura a los 20 días se debería a que a los 4 días postnatales son los receptores β_2 -adrenérgicos los principales responsables de la función contráctil del corazón previo a la inervación simpática cardíaca, algo que a los 20 días posnatales (post inervación simpática) ya no ocurre y toman protagonismo los receptores β_1 -adrenérgicos [91-92], por lo que la cantidad de receptores β_2 -adrenérgicos disminuye mientras la cantidad de receptores β_1 -adrenérgicos aumenta.

Razón receptores β_1 -adrenérgicos/ β_2 -adrenérgicos

En pacientes con fallas cardíacas se han encontrado alteraciones en la población de receptores β -adrenérgicos en el miocardio ventricular encontrando que la proporción β_1 : β_2 cambia, pudiendo disminuir los receptores β_1 -adrenérgicos en hasta un 50% dependiendo de la severidad de la falla cardíaca, sin producir cambios en los receptores β_2 -adrenérgicos [26, 93-95]. Debido a esto es que decidimos analizar la razón de los receptores β_1 -adrenérgicos/ β_2 -adrenérgicos para determinar posibles cambios en la proporción de ellos.

Se observó un aumento en la razón en los corazones de las crías hembras estrés de 20 días en comparación con las controles, lo que se debería al aumento encontrado

en la cantidad de los receptores β_1 -adrenérgicos en esos corazones, tal como se discutió anteriormente. No se encontraron diferencias en la razón en las ratas hembras de 60 días. Sin embargo, se observó una disminución en la razón β_1 -adrenérgicos/ β_2 -adrenérgicos a los 60 días en comparación con los 20 días en los animales controles, lo que se debería al aumento en la cantidad de los receptores β_2 -adrenérgicos que se observó a los 60 días respecto a los 20 días, corroborando así los resultados encontrados previamente.

Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre la respuesta cardíaca y los cardiomiocitos frente a una sobrecarga adrenérgica crónica en ratas hembras

En trabajos previos realizados en el laboratorio, se estudió el efecto del estrés por frío crónico intermitente durante el periodo de gestación en la descendencia adulta en ratas macho, demostrando que las ratas estresadas no presentaron hipertrofia ni fibrosis cardíaca en comparación a las ratas controles. Además, se evaluó la función cardíaca al someter a las ratas machos a una sobrecarga adrenérgica (a través de inyecciones diarias de ISO por 10 días a una dosis de 1 mg/kg de peso). Se observó que las ratas macho estrés presentaban muertes en un 50% de los casos en los tres primeros días de inyecciones, sin encontrar muertes en las ratas controles. Por lo que estos animales estarían presentando alteraciones a nivel cardíaco, lo que los estaría volviendo más susceptibles a daños cardiovasculares y muerte por infartos frente a la presencia de un agente adrenérgico [27]. Debido a esto, se decidió realizar el mismo protocolo en ratas hembras utilizando un equipo de telemetría el cual nos permitiría visualizar lo que estaría sucediendo en tiempo real.

A través del uso del equipo de telemetría y la implantación de un telémetro que registra PA *in vivo* se observaron los registros tanto en condiciones basales como durante y luego de las inyecciones diarias de ISO en ratas hembras controles y estrés. En los registros de PA se observó la aparición, en distintas frecuencias, de extrasístoles o contracciones ventriculares prematuras, lo cual es un trastorno del ritmo cardíaco caracterizado por el latido adelantado con respecto a la frecuencia cardíaca normal.

Al comparar los registros en condiciones basales, se encontró que las ratas estrés presentaron extrasístoles antes de iniciarse el tratamiento, algo que no se detectó en

las ratas control. Luego de comenzadas las inyecciones de ISO, en general alrededor del tercer día, se comenzaron a observar extrasístoles en los registros de las ratas controles, algo que aumentó en cantidad a medida que transcurrieron los días de tratamiento. Esto también ocurrió en los registros de las ratas estrés, sin embargo se observaron con una mayor frecuencia que en las ratas controles, lo cual podría explicar las muertes en el 40% de las ratas estrés en los tres primeros días de inyecciones, algo que no sucedió en las ratas controles pero que ya se había observado en las ratas machos estrés [27]. Es decir, se detectaron contracciones antes de que ocurra el vaciado completo del corazón, lo cual indicaría problemas en la repolarización cardíaca. Además, se observaron en las ratas estrés variaciones en la altura de los picos de los registros de la PA lo que nos entregó información sobre el volumen expulsivo cardíaco, estas variaciones en altura serían otro indicio de alteraciones en la conducción cardíaca. Por lo tanto, estas ratas estarían presentando una disminución en el volumen de eyección (a través de contracciones extras), algo que estaría ocurriendo hasta que el corazón no es capaz de sobrellevar la demanda, causando muerte por infarto cardíaco.

Cabe destacar que el protocolo de inyecciones que se realizó en ratas hembras fue con una dosis de 125 µg/kg de peso, mientras que el protocolo aplicado en ratas machos fue realizado con una dosis de 1 mg/kg de peso. En estudios previos de nuestro laboratorio se encontró que las ratas hembras presentaron una mayor concentración de receptores β -adrenérgicos y mayores niveles de NA cardíaca que las ratas machos [23], además de encontrar que serían más susceptibles a la estimulación β -adrenérgica con ISO, puesto que a dosis similares a las de los machos se produjo la muerte de todas las ratas hembras [30] indicando que la existencia de una mayor concentración de receptores les conferiría una mayor sensibilidad a la estimulación adrenérgica.

En diversos trabajos se han demostrado respuestas distintas frente a situaciones de estrés prenatal dependiendo del sexo de la rata, encontrando que en general las hembras presentan una mayor reactividad cardiovascular [96]. En un trabajo en que se estresó a ratas preñadas mediante restricción y luz tres veces por día durante la última semana de gestación, se observó que al someter las crías adultas a una situación de estrés por restricción presentaban un aumento en la presión arterial sistólica, algo que

se no se observa en condiciones basales. Junto con esto, se encontró que la respuesta cardiovascular de las hembras era mayor y más prolongada que los machos [97]. Esto también se observa en otro estudio en donde se estresó por calor, luz e inmovilización a ratas preñadas [17].

Puesto que se encontraron diferencias en la respuesta cardiovascular de las crías hembras adultas, presentando mayores muertes frente al ISO, se decidió estudiar si es que estarían presentando hipertrofia (área y perímetro de los cardiomiocitos) y/o fibrosis (colágeno) cardíaca. Se observó que efectivamente los cardiomiocitos de ratas estrés son más grandes (tanto en área como en perímetro) que los de ratas controles, lo cual indicaría la presencia de hipertrofia cardíaca en las ratas estrés, lo cual no se observa en los corazones de las crías machos [27]. Además, se observó que el ISO genera un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos tanto estrés como controles, lo cual es un efecto esperado para este fármaco [98]. Sin embargo, se encontró que el tamaño de los cardiomiocitos del grupo estrés aumenta en menor medida frente al ISO con respecto a los cardiomiocitos del grupo control. Esto podría explicarse a través de los cambios encontrados en la afinidad de los receptores β -adrenérgicos descritos previamente en este trabajo, lo cual podría generar que, frente a una misma dosis de ISO (agonista β -adrenérgico) éste estaría actuando sobre los receptores con una afinidad disminuida y por lo tanto, el fármaco estaría generando una menor respuesta, la cual se traduce en una menor hipertrofia cardíaca.

Finalmente, al determinar el porcentaje de colágeno presente en los corazones de las ratas controles, estrés, control ISO y estrés ISO, no se encontraron diferencias, por lo que estos corazones no estarían presentando fibrosis cardíaca.

En resumen, las ratas hembras estrés presentan un corazón funcional en condiciones basales, pese a presentar extrasístoles. Sin embargo, éste no es capaz de sobrellevar una situación de sobrecarga adrenérgica, además de presentar hipertrofia de los cardiomiocitos. Esto es algo que también se ha observado en corazones de ratas fetales de gestaciones en condiciones hipóxicas [99-100], en donde se observó que los cardiomiocitos presentan una mayor proporción de células binucleadas (algo que en ratas ocurre normalmente en las dos primeras semanas postnatales) y son más grandes que los cardiomiocitos de ratas controles de la misma edad, que aunque estos

corazones en ratas adultas presentan respuestas normales en condiciones basales, no son capaces de generar respuestas adecuadas frente a situaciones de estrés [101].

Efecto del estrés crónico durante la gestación sobre la respuesta glicémica e insulínica frente a una sobrecarga de glucosa

Tal como se explicó previamente, el aumento encontrado en NA podría estar generando una hiperglicemia materna. Se ha observado en hijos adolescentes de madres que tuvieron diabetes gestacional que frente a un test de tolerancia a la glucosa presentan respuestas alteradas, encontrando que esto los predispone a padecer diabetes en la adultez [102]. Estas respuestas alteradas también estarían presentes en modelos de estrés prenatal, por ejemplo en un modelo de estrés social (exposición a una rata hembra lactante y agresiva) durante el final de la preñez, se analizó el efecto sobre la regulación de la glucosa en las crías una vez alcanzada la adultez. Se determinó que esta situación de estrés no genera cambios a los 3 meses, sin embargo se observa una hiperinsulinemia luego de una sobrecarga de glucosa oral en las hembras de 6 meses [103]. Por otra parte, en un modelo de insuficiencia placentaria en donde se observó que las crías hembras una vez alcanzada la adultez, presentaban elevados niveles de glucosa en ayuno junto con una disminución en los niveles de insulina, además de presentar niveles elevados de glucosa frente a una sobrecarga de glucosa [104]. Además, se ha visto que al inhibir la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2, enzima encargada de inactivar la corticosterona y por lo tanto, de proteger al feto del exceso de glucocorticoides maternos, produce un aumento en las concentraciones de glucosa plasmáticas en ayuno junto con un aumento en los niveles de glucosa y de insulina frente a una sobrecarga de glucosa oral en las crías adultas. El exceso de glucocorticoides materno estaría predisponiendo a una hiperglicemia en la vida postnatal de las crías [105]. Por lo que para determinar qué estaría sucediendo en las ratas hembras estrés adultas se realizó un test de tolerancia a la glucosa oral.

Al determinar los niveles de glucosa y de insulina en condiciones de ayuno se observó que las ratas hembras estrés presentaron una mayor concentración de insulina sin presentar diferencias en las concentraciones de glucosa. Al realizar el índice HOMA, se obtuvo que las ratas estrés presentaron resistencia a la insulina.

CONCLUSIÓN

La exposición a una situación de estrés por frío durante el periodo de gestación produce un aumento en los niveles de NA en la sangre materna, esto se correlaciona con una disminución en la funcionalidad de los NET placentarios. Como bien sabemos, la placenta juega un rol esencial en mantener bajas las concentraciones de monoaminas en la circulación uteroplacental, pero esta situación de estrés estaría disminuyendo la capacidad de la placenta de realizar el *clearance* de NA desde el feto hacia la circulación materna, lo que podría estar generando que los fetos se desarrollen en un medio con concentraciones aumentadas de catecolaminas en la sangre fetal, algo similar a lo que ocurre en pacientes con insuficiencia placentaria, como por ejemplo en casos de preeclampsia.

Luego del nacimiento, las crías ya no se encuentran expuestas a este aumento de NA pero parecerían tener aumentada la actividad del SNS (algo que lamentablemente no pudimos confirmar), observando que los corazones estrés presentaron hipertrofia basal y frente a una sobrecarga adrenérgica crónica el corazón estrés presentó una marcada presencia de extrasístoles las cuales aumentaron en cantidad con la administración de ISO, produciendo fallo cardíaco con la posterior muerte en el 40% de los animales estrés. Junto con esto, las crías hembras adultas presentaron resistencia a la insulina, lo que podría explicarse puesto que si poseen una mayor actividad del SNS, estarían produciendo hiperglicemia crónica, lo que se traduciría en una mayor liberación de insulina en condiciones basales.

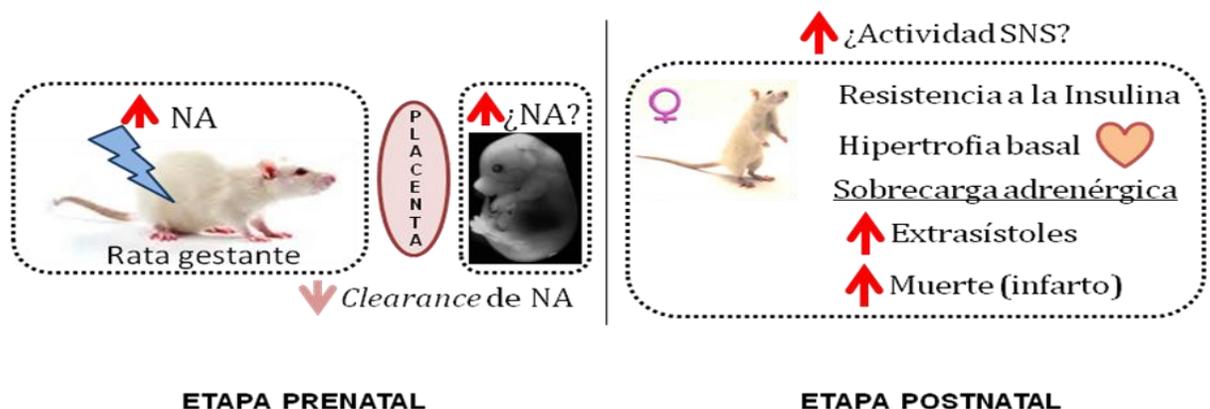


Figura 29: Modelo del efecto de la activación del SNS materno a través del protocolo de estrés por frío sobre las crías hembras.

REFERENCIAS

1. Lima G, A.L., Casanova P, Casanova P, Casanova C, García E, *Influencia del estrés ocupacional en el proceso salud-enfermedad*. Rev Cub Med Mil, 2003. **8**(2).
2. Sánchez M, G.R.M., Marsán V, Macías C, *Asociación entre el estrés y las enfermedades infecciosas, autoinmunes, neoplásicas y cardiovasculares*. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter, 2006. **22**(3).
3. Cottrell, E.C. and J.R. Seckl, *Prenatal stress, glucocorticoids and the programming of adult disease*. Front Behav Neurosci, 2009. **3**: p. 19.
4. Pacak, K., et al., *Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity*. Am J Physiol, 1998. **275**(4 Pt 2): p. R1247-55.
5. Goldstein, D.S. and I.J. Kopin, *Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathoneural responses to stressors: a meta-analysis*. Endocr Regul, 2008. **42**(4): p. 111-9.
6. Gordon, R., et al., *Increased synthesis of norepinephrine and epinephrine in the intact rat during exercise and exposure to cold*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 1966. **153**(3): p. 440-447.
7. Benedict, C., M. Fillenz, and C. Stanford, *Noradrenaline release in rats during prolonged cold-stress and repeated swim-stress*. British Journal of Pharmacology, 1979. **66**: p. 521-524.
8. Godfrey, K.M. and D.J. Barker, *Fetal programming and adult health*. Public Health Nutr, 2001. **4**(2B): p. 611-24.
9. Kajantie, E., *Fetal origins of stress-related adult disease*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1083**: p. 11-27.
10. Phillips, D.I.W., A. Jones, and P.A. Goulden, *Birth Weight, Stress, and the Metabolic Syndrome in Adult Life*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006. **1083**(1): p. 28-36.
11. Godfrey, K.M. and D.J. Barker, *Fetal nutrition and adult disease*. Am J Clin Nutr, 2000. **71**(5 Suppl): p. 1344S-52S.
12. Langley-Evans, S.C., *Metabolic programming in pregnancy: studies in animal models*. Genes Nutr, 2007. **2**(1): p. 33-8.
13. Singh, R.R., et al., *Prenatal corticosterone exposure results in altered AT1/AT2, nephron deficit and hypertension in the rat offspring*. J Physiol, 2007. **579**(Pt 2): p. 503-13.
14. Guo, A., et al., *Effect of chronic intermittent stress on rat pregnancy and postnatal development*. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, 1993. **51**(1): p. 41-5.
15. Grigore, D., N.B. Ojeda, and B.T. Alexander, *Sex differences in the fetal programming of hypertension*. Gend Med, 2008. **5 Suppl A**: p. S121-32.
16. Grigore, D.O., N. Alexander, B., *Sex differences in the fetal programming of cardiovascular disease*. Gend Med, 2009. **5**: p. S121-S132.
17. Igosheva, N., et al., *Prenatal stress alters cardiovascular responses in adult rats*. J Physiol, 2004. **557**(Pt 1): p. 273-85.
18. Benedict, C.R., M. Fillenz, and C. Stanford, *Noradrenaline release in rats during prolonged cold-stress and repeated swim-stress*. Br J Pharmacol, 1979. **66**(4): p. 521-4.
19. Dorfman, M., et al., *Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat*. Biol Reprod, 2003. **68**(6): p. 2038-43.

20. Dorfman, M., et al., *Chronic-intermittent cold stress in rats induces selective ovarian insulin resistance*. Biol Reprod, 2009. **80**(2): p. 264-71.
21. Barra, R., *Estrés por frío sobre la rata gestante. Cambios en la función ovárica de la progenie*. Memoria de título de postgrado para la obtención del título de Doctor en Farmacología, 2012.
22. Luna, S.L., et al., *In vivo beta-adrenergic blockade by propranolol prevents isoproterenol-induced polycystic ovary in adult rats*. Horm Metab Res, 2012. **44**(9): p. 676-81.
23. Piquer, B., *Cambios en los receptores β -adrenérgicos cardíacos en la progenie de ratas madres estresadas durante la gestación*. Memoria de título de pregrado para la obtención del título de Química Farmacéutica, 2011.
24. Saito, K., et al., *Characterization of beta 1- and beta 2-adrenoceptor subtypes in the rat atrioventricular node by quantitative autoradiography*. Circ Res, 1988. **62**(1): p. 173-7.
25. Buxton, I. and L. Brunton, *Direct analysis of beta-adrenergic receptor subtypes on intact adult ventricular myocytes of the rat*. Circulation Research, 1985. **56**(1): p. 126-132.
26. Bristow, M.R., et al., *Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure*. Circ Res, 1986. **59**(3): p. 297-309.
27. Bahamondes, G., *Estrés crónico intermitente aplicado en ratas durante el período de gestación induce "programming" sobre el tejido cardíaco en la descendencia de ratas machos*. Memoria de título de pregrado para la obtención del título de Químico Farmacéutico, 2011.
28. Limas, C.J., *Increased number of beta-adrenergic receptors in the hypertrophied myocardium*. Biochim Biophys Acta, 1979. **588**(1): p. 174-8.
29. Vatner, D.E., et al., *Effects of pressure overload, left ventricular hypertrophy on beta-adrenergic receptors, and responsiveness to catecholamines*. J Clin Invest, 1984. **73**(5): p. 1473-82.
30. Luna, L., *Desarrollo y mantención de ovario poliúístico en rata por sobreestimulación adrenérgica*. Datos preliminares de la memoria de título de postgrado para la obtención del grado de Doctor en Farmacología, 2011.
31. Acevedo S, E.S., Gallardo J.M, Velásquez B, Camargo L, Guzmán M.E, *La placenta humana: Revisión*. Perinatol Reprod Hum, 2008. **22**(3): p. 230-245.
32. Shearman, L.P. and J.S. Meyer, *Norepinephrine transporters in rat placenta labeled with [³H]nisoxetine*. J Pharmacol Exp Ther, 1998. **284**(2): p. 736-43.
33. Ganapathy, V., et al., *Placental transporters relevant to drug distribution across the maternal-fetal interface*. J Pharmacol Exp Ther, 2000. **294**(2): p. 413-20.
34. Mairesse, J., et al., *Maternal stress alters endocrine function of the feto-placental unit in rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2007. **292**(6): p. E1526-33.
35. Baserga, M., et al., *Uteroplacental insufficiency alters hepatic expression, phosphorylation, and activity of the glucocorticoid receptor in fetal IUGR rats*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2005. **289**(5): p. R1348-53.
36. Meaney, M.J., M. Szyf, and J.R. Seckl, *Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health*. Trends Mol Med, 2007. **13**(7): p. 269-77.

37. LaMarca, B., et al., *Placental Ischemia and Resultant Phenotype in Animal Models of Preeclampsia*. *Curr Hypertens Rep*, 2016. **18**(5): p. 38.
38. Schobel, H.P., et al., *Preeclampsia -- a state of sympathetic overactivity*. *N Engl J Med*, 1996. **335**(20): p. 1480-5.
39. Takiuti, N.H., S. Kahhale, and M. Zugaib, *Stress-related preeclampsia: an evolutionary maladaptation in exaggerated stress during pregnancy?* *Med Hypotheses*, 2003. **60**(3): p. 328-31.
40. Roberts, J.M. and D.W. Cooper, *Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia*. *Lancet*, 2001. **357**(9249): p. 53-6.
41. Dekker, G.A., P.Y. Robillard, and T.C. Hulsey, *Immune maladaptation in the etiology of preeclampsia: a review of corroborative epidemiologic studies*. *Obstet Gynecol Surv*, 1998. **53**(6): p. 377-82.
42. Na, K.H., et al., *Altered expression of norepinephrine transporter and norepinephrine in human placenta cause pre-eclampsia through regulated trophoblast invasion*. *Clin Exp Reprod Med*, 2013. **40**(1): p. 12-22.
43. Melikian, H.E., et al., *Human norepinephrine transporter. Biosynthetic studies using a site-directed polyclonal antibody*. *J Biol Chem*, 1994. **269**(16): p. 12290-7.
44. Mandela, P. and G.A. Ordway, *The norepinephrine transporter and its regulation*. *J Neurochem*, 2006. **97**(2): p. 310-33.
45. Bottalico, B., et al., *Norepinephrine transporter (NET), serotonin transporter (SERT), vesicular monoamine transporter (VMAT2) and organic cation transporters (OCT1, 2 and EMT) in human placenta from pre-eclamptic and normotensive pregnancies*. *Placenta*, 2004. **25**(6): p. 518-29.
46. Gu, W. and C.T. Jones, *The effect of elevation of maternal plasma catecholamines on the fetus and placenta of the pregnant sheep*. *J Dev Physiol*, 1986. **8**(3): p. 173-86.
47. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. *Anal Biochem*, 1976. **72**: p. 248-54.
48. Lara, H. and W. Bastos-Ramos, *Glutamate and kainate effects on the noradrenergic neurons innervating the rat vas deferens*. *J Neurosci Res*, 1988. **19**(2): p. 239-44.
49. Ferruz, J., et al., *Release of norepinephrine from the rat ovary: local modulation of gonadotropins*. *Biol Reprod*, 1991. **45**(4): p. 592-7.
50. Muniyappa, R., et al., *Comparison between surrogate indexes of insulin sensitivity/resistance and hyperinsulinemic euglycemic clamp estimates in rats*. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2009. **297**(5): p. E1023-9.
51. Sakr, H.F., *Effect of sitagliptin on the working memory and reference memory in type 2 diabetic Sprague-Dawley rats: possible role of adiponectin receptors 1*. *J Physiol Pharmacol*, 2013. **64**(5): p. 613-23.
52. Huang, B.W., et al., *The effect of high-fat and high-fructose diets on glucose tolerance and plasma lipid and leptin levels in rats*. *Diabetes Obes Metab*, 2004. **6**(2): p. 120-6.
53. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. *Anal Biochem*, 1987. **162**(1): p. 156-9.
54. Greiner, M., et al., *Catecholamine uptake, storage, and regulated release by ovarian granulosa cells*. *Endocrinology*, 2008. **149**(10): p. 4988-96.

55. Hansson, S.R., et al., *Increased fetal blood pressure response to maternal norepinephrine after pharmacological inhibition of norepinephrine uptake in pregnant sheep*. *Acta Paediatr*, 2007. **96**(5): p. 650-4.
56. Jayanthi, L.D., D.J. Samuvel, and S. Ramamoorthy, *Regulated internalization and phosphorylation of the native norepinephrine transporter in response to phorbol esters. Evidence for localization in lipid rafts and lipid raft-mediated internalization*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(18): p. 19315-26.
57. Balada F, M.C., Nadal R, Redolar D, Silvestre J, *Farmacología y endocrinología del comportamiento*. 2012: p. 34-35.
58. Florez, J., *Farmacología humana*. 2008.
59. Salahpour, A., et al., *Biochemical characterization of beta2-adrenergic receptor dimers and oligomers*. *Biol Chem*, 2003. **384**(1): p. 117-23.
60. Rands, E., et al., *Mutational analysis of beta-adrenergic receptor glycosylation*. *J Biol Chem*, 1990. **265**(18): p. 10759-64.
61. McGraw, D.W. and S.B. Liggett, *Molecular mechanisms of beta2-adrenergic receptor function and regulation*. *Proc Am Thorac Soc*, 2005. **2**(4): p. 292-6; discussion 311-2.
62. Sabri, A., et al., *Coupling function of endogenous alpha(1)- and beta-adrenergic receptors in mouse cardiomyocytes*. *Circ Res*, 2000. **86**(10): p. 1047-53.
63. Barra, R., et al., *Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring*. *Reproduction*, 2014. **148**(2): p. 137-45.
64. Depocas, F. and W.A. Behrens, *Effects of handling, decapitation, anesthesia, and surgery on plasma noradrenaline levels in the white rat*. *Can J Physiol Pharmacol*, 1977. **55**(2): p. 212-9.
65. Popper, C.W., C.C. Chiueh, and I.J. Kopin, *Plasma catecholamine concentrations in unanesthetized rats during sleep, wakefulness, immobilization and after decapitation*. *J Pharmacol Exp Ther*, 1977. **202**(1): p. 144-8.
66. Green, R.D., 3rd and J.W. Miller, *Catecholamine Concentrations: Changes in Plasma of Rats during Estrous Cycle and Pregnancy*. *Science*, 1966. **151**(3712): p. 825-6.
67. Legrand, C. and J.P. Maltier, *Foetal and maternal plasma adrenaline and noradrenaline concentrations in the late pregnant rat: effects of intra-uterine isotonic saline or uterine handling*. *Acta Endocrinol (Copenh)*, 1981. **96**(4): p. 541-5.
68. Dupouy, J.P., H. Coffigny, and S. Magre, *Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats*. *J Endocrinol*, 1975. **65**(3): p. 347-52.
69. Wintour, E.M., et al., *A sequential study of adrenocorticosteroid level in human pregnancy*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 1978. **5**(4): p. 399-403.
70. Wong, D.L., et al., *Glucocorticoid regulation of phenylethanolamine N-methyltransferase in vivo*. *FASEB J*, 1992. **6**(14): p. 3310-5.
71. Voogt, J.L., M. Sar, and J. Meites, *Influence of cycling, pregnancy, labor, and suckling on corticosterone-ACTH levels*. *Am J Physiol*, 1969. **216**(3): p. 655-8.
72. Gewolb, I.H. and J.B. Warshaw, *Fetal and maternal corticosterone and corticosteroid binding globulin in the diabetic rat gestation*. *Pediatr Res*, 1986. **20**(2): p. 155-60.
73. Deutsch-Feldman, M., et al., *Effects of handling and vehicle injections on adrenocorticotrophic and corticosterone concentrations in Sprague-Dawley compared with Lewis rats*. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2015. **54**(1): p. 35-9.

74. Vahl, T.P., et al., *Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats*. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005. **289**(5): p. E823-8.
75. McTernan, C.L., et al., *Reduced placental 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 mRNA levels in human pregnancies complicated by intrauterine growth restriction: an analysis of possible mechanisms*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(10): p. 4979-83.
76. Kajantie, E., et al., *Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 and fetal cortisol/cortisone shuttle in small preterm infants*. J Clin Endocrinol Metab, 2003. **88**(1): p. 493-500.
77. Staud, F., et al., *Corticosterone transfer and metabolism in the dually perfused rat placenta: effect of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2*. Placenta, 2006. **27**(2-3): p. 171-80.
78. Seckl, J.R., *Glucocorticoids, feto-placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease*. Steroids, 1997. **62**(1): p. 89-94.
79. Schwartz, R. and K.A. Teramo, *Effects of diabetic pregnancy on the fetus and newborn*. Semin Perinatol, 2000. **24**(2): p. 120-35.
80. Polanco A, R.M., Palomino MA, Islas S, *Efecto de la diabetes materna en el desarrollo fetal de humanos y ratas*. Ginecol Obstet Mex, 2005. **73**(10): p. 544-552.
81. Bagrov, Y.Y., et al., *Endogenous sodium pump inhibitors, diabetes mellitus and preeclampsia Preliminary observations and a hypothesis*. Pathophysiology, 2007. **14**(3-4): p. 147-51.
82. Puschett, J.B., E. Agunanne, and M.N. Uddin, *Marinobufagenin, resibufogenin and preeclampsia*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1802**(12): p. 1246-53.
83. Wells, J.C., *The thrifty phenotype as an adaptive maternal effect*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2007. **82**(1): p. 143-72.
84. Hales, C.N. and D.J. Barker, *The thrifty phenotype hypothesis*. Br Med Bull, 2001. **60**: p. 5-20.
85. Wu, G., et al., *Maternal nutrition and fetal development*. J Nutr, 2004. **134**(9): p. 2169-72.
86. Lim, K., M.A. Zimanyi, and M.J. Black, *Effect of maternal protein restriction in rats on cardiac fibrosis and capillarization in adulthood*. Pediatr Res, 2006. **60**(1): p. 83-7.
87. Fernandez-Twinn, D.S., et al., *Maternal low-protein diet programs cardiac beta-adrenergic response and signaling in 3-mo-old male offspring*. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2006. **291**(2): p. R429-36.
88. Zylan, K.D. and S.D. Brown, *Effect of stress and food variety on food intake in male and female rats*. Physiol Behav, 1996. **59**(1): p. 165-9.
89. Seckl, J.R. and M.C. Holmes, *Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2007. **3**(6): p. 479-88.
90. Ziegler, M.G., C.R. Lake, and I.J. Kopin, *Plasma noradrenaline increases with age*. Nature, 1976. **261**(5558): p. 333-5.
91. Tucker, D.C. and R. Gist, *Sympathetic innervation alters growth and intrinsic heart rate of fetal rat atria maturing in oculo*. Circ Res, 1986. **59**(5): p. 534-44.
92. Kuznetsov, V., et al., *Beta 2-adrenergic receptor actions in neonatal and adult rat ventricular myocytes*. Circ Res, 1995. **76**(1): p. 40-52.

93. Madamanchi, A., *Beta-adrenergic receptor signaling in cardiac function and heart failure*. *Mcgill J Med*, 2007. **10**(2): p. 99-104.
94. Lohse, M.J., S. Engelhardt, and T. Eschenhagen, *What is the role of beta-adrenergic signaling in heart failure?* *Circ Res*, 2003. **93**(10): p. 896-906.
95. Freedman, N.J. and R.J. Lefkowitz, *Anti-beta(1)-adrenergic receptor antibodies and heart failure: causation, not just correlation*. *J Clin Invest*, 2004. **113**(10): p. 1379-82.
96. Glover, V. and J. Hill, *Sex differences in the programming effects of prenatal stress on psychopathology and stress responses: an evolutionary perspective*. *Physiol Behav*, 2012. **106**(5): p. 736-40.
97. Igosheva, N., et al., *Prenatal stress in the rat results in increased blood pressure responsiveness to stress and enhanced arterial reactivity to neuropeptide Y in adulthood*. *J Physiol*, 2007. **582**(Pt 2): p. 665-74.
98. Leenen, F.H., R. White, and B. Yuan, *Isoproterenol-induced cardiac hypertrophy: role of circulatory versus cardiac renin-angiotensin system*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001. **281**(6): p. H2410-6.
99. Gagnon, R., *Placental insufficiency and its consequences*. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2003. **110 Suppl 1**: p. S99-107.
100. Granger, J.P., et al., *Pathophysiology of preeclampsia: linking placental ischemia/hypoxia with microvascular dysfunction*. *Microcirculation*, 2002. **9**(3): p. 147-60.
101. Louey, S. and K.L. Thornburg, *The prenatal environment and later cardiovascular disease*. *Early Hum Dev*, 2005. **81**(9): p. 745-51.
102. Silverman, B.L., et al., *Impaired glucose tolerance in adolescent offspring of diabetic mothers. Relationship to fetal hyperinsulinism*. *Diabetes Care*, 1995. **18**(5): p. 611-7.
103. Brunton, P.J., et al., *Sex-specific effects of prenatal stress on glucose homeostasis and peripheral metabolism in rats*. *J Endocrinol*, 2013. **217**(2): p. 161-73.
104. Jansson, T. and G.W. Lambert, *Effect of intrauterine growth restriction on blood pressure, glucose tolerance and sympathetic nervous system activity in the rat at 3-4 months of age*. *J Hypertens*, 1999. **17**(9): p. 1239-48.
105. Lindsay, R.S., et al., *Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone*. *Diabetologia*, 1996. **39**(11): p. 1299-305.