



**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR  
LABORATORIO DE NEUROBIOQUÍMICA

**EFFECTO DE LA EXPOSICIÓN GESTACIONAL A ESTRÉS  
SIMPÁTICO SOBRE LOS RECEPTORES  $\beta$ -  
ADRENÉRGICOS CARDÍACOS, CONCENTRACIÓN DE  
NORADRENALINA Y TESTOSTERONA EN LAS CRÍAS  
MACHOS DURANTE EL DESARROLLO**

**Memoria de título para optar al Título Profesional de Bioquímica**

**ANDREA LESLY FLORES REYES**

**DIRECTORES DE TESIS**

Dr. Hernán Lara Peñaloza

Dra. Beatriz Piquer Franco

**PROFESOR PATROCINANTE**

Hernán Lara Peñaloza

**Santiago, Chile 2018**

## **AGRADECIMIENTOS**

Son muchas las personas que han participado en este largo camino que culmina con el término de esta memoria. En primer lugar agradezco a mi director de tesis, Dr Hernán Lara por la oportunidad de desarrollar este trabajo y sin duda agradezco su constante apoyo y preocupación. También agradezco a todos los que trabajan en el Laboratorio de Neurobioquímica. Son un grupo con alta calidad humana, siempre dispuestos a ayudar e hicieron que mi estancia en el laboratorio fuera muy agradable.

Durante los años de universidad tuve la oportunidad de conocer a grandes personas y sin duda Javiera y Lisette (La Flaca) fueron una de ellas. Con ustedes las clases, seminarios y/o laboratorios fueron mucho más divertidos. Fueron un constante apoyo y simplemente agradezco haberlas conocido.

También tengo que agradecer a Andrés y José, quienes fueron grandes compañeros en estos últimos ramos de carrera. Les agradezco por haberme salvado de muchas, y avisado de tantas tareas, As y controles; de haberme anotado en la lista cuando llegaba tarde o simplemente no llegaba (disculpa Andrés). Son grandes personas y agradezco su amistad.

Finalmente agradezco a mi familia, especialmente a mis papas, por la oportunidad de estudiar, por no presionarme y mostrarme que lo más importante era sacar mi carrera. Gracias por todo lo que me han dado

## **FINANCIAMIENTO**

Esta memoria fue financiada por el Proyecto FONDECYT N°1170291.

Fue realizada bajo la dirección del Dr. Hernán Lara P y Dra Beatriz Piquer F. 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.

# 1. INDICE GENERAL

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iii
<b>1. INDICE GENERAL</b> .....	v
<b>2. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....	vii
<b>3. ABREVIACIONES</b> .....	ix
<b>4. RESUMEN</b> .....	x
<b>5. ABSTRACT</b> .....	xiii
<b>6. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>6.1 Enfermedades cardiovasculares y programación fetal</b> .....	1
<b>6.2 Tipos de programación fetal y sus consecuencias</b> .....	2
<b>6.3 Efecto del estrés simpático en el corazón de las crías</b> .....	6
<b>6.4 Programación fetal diferencial dependiendo el sexo de la cría</b> .....	8
<b>6.5 Efecto del estrés en la secreción de testosterona en la vida adulta</b> .....	9
<b>HIPÓTESIS</b> .....	12
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	12
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	12
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	13
<b>7.1 Animales</b> .....	13
7.1.2 Preñez controlada.....	13
<b>7.2 Determinación de Corticosterona (CORT), Testosterona y Hormona anti-mülleriana (AMH)</b> .....	16
<b>7.3 Cuantificación de noradrenalina por kit de ELISA</b> .....	17
<b>7.4 Determinación de Receptores <math>\beta_1</math> y <math>\beta_2</math>-adrenérgicos cardíacos mediante Western Blot</b> .....	18
<b>7.5 Análisis estadístico</b> .....	22
<b>8. RESULTADOS</b> .....	23
<b>8.1 Concentración de testosterona plasmática</b> .....	23
<b>8.2 Concentración de AMH plasmática</b> .....	25

<b>8.3 Concentración de corticosterona plasmática .....</b>	<b>27</b>
<b>8.4 Concentración de noradrenalina plasmática.....</b>	<b>29</b>
<b>8.5 Concentración de noradrenalina cardíaca .....</b>	<b>31</b>
<b>8.6 Cuantificación de receptor <math>\beta_1</math>-adrenérgico cardíaco .....</b>	<b>34</b>
<b>8.7 Cuantificación de receptor <math>\beta_2</math>-adrenérgico cardíaco .....</b>	<b>36</b>
<b>8.8 Razón de receptores <math>\beta_1/\beta_2</math> –adrenérgico cardíaco.....</b>	<b>38</b>
<b>8.9 Razón entre el peso de los corazones y peso corporal de las crías machos. .....</b>	<b>40</b>
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>9.1 Etapa prenatal .....</b>	<b>44</b>
<b>9.2 Efecto del estrés crónico por frío sobre los niveles plasmáticos de Testosterona y AMH de la descendencia macho. ....</b>	<b>45</b>
<b>9.3 Efecto del estrés crónico por frío en los niveles plasmáticos de corticosterona de la descendencia macho.....</b>	<b>47</b>
<b>9.4 Efecto del estrés crónico por frío sobre los niveles de receptores <math>\beta_1</math> y <math>\beta_2</math>- adrenérgicos cardíacos de la descendencia macho.....</b>	<b>51</b>
<b>9.5 Razón receptores <math>\beta_1</math> / <math>\beta_2</math>-adrenérgicos cardíacos.....</b>	<b>52</b>
<b>9.6 Efecto del estrés crónico por frío en la concentración de Noradrenalina plasmática y cardíaca de la descendencia macho. ....</b>	<b>53</b>
<b>10. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>55</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>56</b>

## 2. INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Protocolo grupo control y estrés por frío.....	15
Figura 2. Concentración de Testosterona plasmática en crías machos.....	24
Figura 3. Concentración de AMH plasmática en crías machos. ....	26
Figura 4. Concentración de corticosterona plasmática de crías machos.....	28
Figura 5. Concentración de NA plasmática de crías machos.....	30
Figura 6. Concentración de NA en el corazón de crías machos.....	32
Figura 7. Receptor $\beta_1$ -adrenérgico cardíaco en corazones de crías machos controles y estrés.....	35
Figura 8. Receptor $\beta_2$ -adrenérgicos cardíaco en corazones de crías machos controles y estrés.....	37
Figura 9. Razón receptores $\beta_1/\beta_2$ -adrenérgico en los corazones de las crías machos controles y estrés de 20 y 60 días de edad.....	39
Figura 10. Peso de las crías machos y de sus corazones a distintas edades.....	41
Figura 11. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.....	50
Tabla 1. Detalle de anticuerpos utilizados.....	21

### 3. ABREVIACIONES

<b>A</b>	: Adrenalina
<b>ACTH</b>	: Hormona adrenocorticotropina
<b>AMH</b>	: Hormona Anti-Mülleriana
<b>CORT</b>	: Corticosterona
<b>CRH</b>	: Hormona liberadora de corticotropina
<b>ECV</b>	: Enfermedades cardiovasculares
<b>EDTA</b>	: Ácido etilendiaminotetraacético
<b>GAPDH</b>	: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>HCl</b>	: Ácido clorhídrico
<b>HHA</b>	: Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal
<b>HHG</b>	: Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal
<b>NA</b>	: Noradrenalina
<b>NaCl</b>	: Cloruro de sodio
<b>Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	: Disulfito de sodio
<b>NET</b>	: Transportador de noradrenalina
<b>SDS</b>	: Dodecilsulfato sódico
<b>SNS</b>	: Sistema nervioso simpático
<b>TBST</b>	: Amortiguador salino con Tween
<b><sup>3</sup>H-NA</b>	: Noradrenalina tritiada
<b>11β-HSD2</b>	: 11β-hidroxiesteroide deshidrogenasa Tipo 2

## 4. RESUMEN

El estrés es una reacción fisiológica del organismo, que lo prepara para afrontar una situación que se percibe como amenazante. La manera del organismo de responder es mediante la activación del sistema nervioso simpático (SNS), que da lugar a la respuesta de lucha o huida, provocando un aumento en la tasa de recambio de noradrenalina (NA) en órganos con inervación simpático, como es el caso del corazón. Un incremento de NA cardíaca produce un aumento de su frecuencia y gasto cardíaco. Por otro lado, se ha observado que la exposición a frío crónico causa la activación exclusiva del SNS. Tal aumento en la actividad durante el período de gestación puede causar efectos deletéreos del feto en desarrollo, especialmente si este coincide con el llamado “periodo crítico”, donde el organismo es más susceptible a cambios en el ambiente intrauterino, causando la adaptación del feto a través de la programación permanente de su desarrollo postnatal.

En este trabajo evaluamos el efecto del estrés gestacional por frío crónico (4°C, 3h/día, 21 días) en la descendencia macho de ratas Sprague-Dawley, en tres tipos de ejes que normalmente están involucrados en la respuesta al estrés: Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA), Hipotálamo-Hipófisis-Gónadas (HHG) y neuronal-simpático-órgano blanco (corazón). Como controles usamos la descendencia macho de madres que se mantuvieron a 20°C durante toda la gestación. Para evaluar los distintos ejes estudiados, medimos la concentración



de corticosterona (CORT), testosterona, hormona antimülleriana (AMH) y NA desde el plasma sanguíneo (ensayos de ELISA), como también la NA y receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$  -adrenérgicos desde el tejido cardíaco (estos últimos por *western blot*). Las crías machos que fueron expuestas al estrés durante la gestación, estudiadas a los 20 días de edad (edad prepúber/juvenil) y a los 60 días de edad (edad adulta), aumentaron los niveles plasmáticos de CORT, y disminuyeron los niveles de NA y de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos cardíacos. Por otro lado, no se encontraron cambios en los niveles plasmáticos de NA, de testosterona ni en los niveles de AMH.

Los resultados obtenidos sugieren que la sobre-activación simpática durante la gestación, producto del estrés por frío, no estaría afectando el eje HHG de la descendencia, ya que no se observan cambios en la testosterona plasmática de las crías estresadas en la vida fetal, pero sí al eje HHA, apoyado por el aumento de CORT que se expresó tanto durante la etapa prepuberal como después de la pubertad. Además estaría afectado el eje neuronal-simpático a nivel cardíaco en la descendencia, mostrando menor concentración de NA y de receptores  $\beta_1$ -adrenérgico. Esta disminución de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos y NA podría ser debido al aumento crónico en los niveles de CORT.

## 5. ABSTRACT

**Effect of the gestational exposure to sympathetic stress in cardiac  $\beta$ -adrenergic receptors, concentration of noradrenaline and testosterone in the male offspring during the development.**

Stress is a physiological reaction of the organism that prepares it to face a situation that is perceived as threatening. The body's response to stress stimulus is through the activation of the sympathetic nervous system (SNS), which leads to the fight-or-flight response, causing an increase in the turnover rate of noradrenaline (NA) in organs with sympathetic innervation, as is the case of the heart. An increase in cardiac NA leads to an increase in cardiac output and frequency. Secondly, it has been shown that chronic cold exposure causes the exclusive activation of the SNS. Such increase in the activity during the gestation period can cause deleterious effects on the developing fetus, mainly if this coincides with the so called "critical period", where the organism is more susceptible to changes in the environment in which it develops, promoting the adaptation of the fetus through permanent programming of its postnatal development.

Taking this into consideration, in this work we evaluated the effect of gestational stress caused by chronic cold (4°C, 3h/day, for 21 days) in the male Sprague-Dawley rats offspring in three types of axis that normally are involved in the stress response: Hypothalamus-pituitary-Adrenal (HPA), Hypothalamus-

pituitary-Gonads (HHG) and neural-sympathetic-target organ (heart). As control group, we used the male offspring of pregnant rats that were kept at 20°C during all the gestation. To evaluate the different studied axis, we measured the corticosterone (CORT), testosterone, antimüllerian hormone (AMH) and NA concentrations from the blood plasma (ELISA assays), and the noradrenaline and  $\beta_1/\beta_2$  -adrenergic receptors from the cardiac tissue (through western blot technique). The male offspring that was exposed to stress during the gestation, studied at 20 and 60 days of age (prepuberal and adult stage, respectively), increased the plasmatic levels of CORT and decreased the NA and cardiac  $\beta_1$ -adrenergic receptor levels. Conversely, we didn't find changes in the plasmatic levels of NA, testosterone or AMH.

The results suggest that the sympathetic over-activation during the gestation, caused by cold stress, would not be affecting the HHG axis, since we didn't observed changes in the plasma testosterone of the offspring that was stressed during the fetal life, but it does affect the HHA axis, which is supported by the increase of the expressed CORT in the prepuberal and adult stage. The neural-sympathetic axis seems to be affected at cardiac level in the offspring, showing a lower concentration of noradrenaline and  $\beta_1$ -adrenergic receptors. This decrease of the  $\beta_1$ -adrenergic receptors and NA might be due to chronic increase in CORT levels.

## **6. INTRODUCCIÓN**

### **6.1 Enfermedades cardiovasculares y programación fetal**

Según datos entregados por el Instituto Nacional de Estadísticas (INE) en el año 2015, las enfermedades cardiovasculares (ECV) constituyen en Chile la primera causa de muerte en la población adulta, con tasas de alrededor de un 27%. A pesar de que no se aprecia un significativo aumento de su frecuencia, se ha observado que factores de riesgo tales como el tabaquismo, el sedentarismo, el consumo frecuente de alcohol, entre otros, estarían presentes cada vez a edades más tempranas (1). A su vez, se ha informado en Chile un incremento de la prevalencia de obesidad, hipertensión arterial, hipercolesterolemia y resistencia a la insulina, siendo estos parámetros, los más elevados en países de América Latina (2).

Si bien es cierto que, en general, las ECV se relacionarían con el estilo de vida de las personas, y que los factores de riesgo ya mencionados aumentarían su prevalencia, también se ha documentado la incidencia de factores independientes al estilo de vida, y casos en que el individuo estaría predispuesto desde su nacimiento, a padecer enfermedades cardiovasculares (3), (4).

En ese sentido, el término “programación fetal”, ha sido utilizado para describir cómo un estímulo o daño producido durante periodos críticos del desarrollo de un sujeto provoca cambios permanentes, que se manifiestan a largo plazo en la estructura y función fisiológica y/o en el metabolismo del mismo (4). El concepto de “programación fetal” explicaría el complejo balance entre cómo la función genética es regulada en condiciones normales y cómo es afectada por el medio ambiente externo, provocando, por ejemplo, cambios en el transporte de nutrientes, oxígeno o desbalance endocrino desde la madre hacia el feto (5). La placenta clave durante los llamados periodos críticos del desarrollo, ya que cualquier cambio podría generar efectos en el correcto desarrollo fetal, por ende, en el desarrollo hepático, neural, del páncreas, sistema reproductivo y cardiovascular, entre otros órganos (6).

## **6.2 Tipos de programación fetal y sus consecuencias**

Mediante estudios experimentales efectuados en animales, se ha logrado documentar diversos ejemplos de programación fetal, ya sea producto de la desnutrición maternal, por hipoxia durante el periodo de gestación, insuficiencia placentaria o tratamiento con glucocorticoides durante el periodo prenatal (7).

Así por ejemplo, la desnutrición de la madre ocurrida durante la vida prenatal provoca la adaptación del feto a fin de asegurar su propia sobrevivencia. Sin embargo, estas modificaciones metabólicas durante la etapa prenatal pueden tener graves consecuencias en la adultez. Situación observada en ratas preñadas que recibieron una dieta con baja concentración proteica, causando en las crías un bajo peso al nacer e hipertensión arterial en ambos sexos en la edad adulta (7), (8). Ello demostraría una programación fetal a través de cambios nutricionales.

En ese orden de ideas, también se ha comprobado que, durante la gestación, el estrés funciona como un estímulo que promueve la programación fetal dependiente del tipo de estrés. El estrés se define como una amenaza a la homeostasis del organismo, frente al cual éste reacciona para asegurar su sobrevivencia (9). Sin embargo, los mecanismos fisiológicos implicados en su respuesta son dependientes del tipo de estímulo que lo provoque. Se han reconocido principalmente dos vías de activación producto del estrés. La primera vía promueve la sobreactivación del eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal (HHA) donde la hormona liberadora de corticotropina (CRH) es secretada rápidamente por el hipotálamo frente a una situación de estrés y controla la

síntesis de la adrenocorticotropina (ACTH) desde la hipófisis, la cual estimula la síntesis y liberación de glucocorticoides desde la médula adrenal. El aumento de glucocorticoides es observado en casos de estrés psicológico, desnutrición, restricción de movimiento, entre otras (10) (11).

Estudios en humanos han probado que la alta concentración de cortisol en el plasma en la vida adulta tiene relación con el bajo peso al nacer y riesgos a intolerancia a la glucosa, hipertensión y dislipidemia (12). Como resultado de esta asociación, se ha propuesto que la programación del eje HHA en el útero está relacionada con el desarrollo de ECV, resistencia a la insulina y diabetes durante la vida postnatal (13). En el caso de ratas tratadas diariamente con Dexametasona, 0,1 mg/kg, durante los días 14-19 de gestación se observó elevada concentración de CORT en las crías machos adultos y se asoció con un aumento de la presión arterial (14).

La segunda vía se relaciona a una respuesta neuroquímica al estrés, provocando un aumento de catecolaminas presentes en el sistema circulatorio desde el SNS, este sistema ocupa la adrenalina (A) y noradrenalina (NA) que actúan en el cerebro en lugares que controlan la atención y acciones de respuesta como la de “pelea-huida”, la activación de este eje genera aumento

de la frecuencia cardíaca y respiratoria, dilatación de las pupilas, aumento de la sudoración e inhibición de la motilidad digestiva (10).

Benedict et al (15), estudió el efecto de la exposición a estrés por frío crónico en ratas Sprague Dawley, para esto, se expusieron a una temperatura de 4°C durante 6 horas diarias por 4 días y por otro lado, estudió el efecto de la exposición a estrés por nado en agua, (un minuto de nado en una piscina que se encontraba a 10°C). Esto se realizó 5 veces en un intervalo de 30 minutos. En ambas situaciones de estrés se observó un marcado aumento en la NA plasmática, confirmando que este tipo de estrés, provocan en las ratas la activación del SNS (15). Además, en otros estudios se vio el efecto del estrés crónico por frío (nadar por 10 minutos a 4°C, dos veces al día) en ratas hembras Wistar preñadas y estudiadas en distintos momentos de la gestación (E1-11, E12-21 y E1-21) y los efectos que este estrés producía en las crías. Observaron que el estrés en la primera mitad de la gestación (E1-11) es más perjudicial para las crías, provocando ratas con menor peso y menor tamaño con respecto al control sin estrés, y a la vez obteniendo más muertes postnatales de estas crías que su contraparte no estresada durante la gestación (16).



En nuestro laboratorio se ha analizado el efecto del estrés por frío durante la gestación y sus consecuencias en la madre. Se observó un aumento significativo de la NA plasmática a los 19 días de gestación, como también una disminución en la funcionalidad de los transportadores de noradrenalina (NET) placentarios (17), que se encargan de mantener bajas las concentraciones de NA en la circulación uteroplacental, lo que sugiere que producto del estrés crónico por frío durante la gestación, el feto se estuviese desarrollando en un ambiente con exceso de NA.

### **6.3 Efecto del estrés simpático en el corazón de las crías**

El SNS se encarga de la regulación de muchos órganos, entre ellos el hígado promoviendo la gluconeogénesis, la broncodilatación pulmonar, la lipólisis de tejidos adiposos y aumenta el *output* cardíaco (cronotropismo y ionotropismo). Todo esto está mediado por los receptores adrenérgicos presente en estos tejidos.

Es así como, los receptores adrenérgicos son una clase de receptores asociados a la proteína G, existen dos tipos principales de receptores, el alfa y beta adrenérgico, los cuales son activados por catecolaminas, como la A y NA. En el corazón de ratas es posible encontrar dos subtipos de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, receptor  $\beta_1$  y  $\beta_2$ , siendo el primero el que se encuentra en mayor

cantidad en el corazón y presenta mayor afinidad por NA, pero ambos receptores se encargan de mediar el cronotropismo e ionotropismo cardíaco (18).

Es por esto que, frente a una situación de estrés se activará el SNS, produciendo un aumento en la liberación de NA y con ello un aumento en la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos, con su concomitante aumento de la frecuencia cardíaca. Se ha documentado, que en patologías como la insuficiencia cardíaca en humano existe un aumento permanente de NA en el órgano y una disminución del receptor  $\beta_1$ -adrenérgicos, mecanismo utilizado por el corazón para modular el constante estímulo adrenérgico, disminuyendo la presencia de este receptor en la superficie celular por *down-regulation* del receptor, sin que se observen cambios en los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (19).

Junto con lo anterior, estudios realizados en nuestro laboratorio, donde se analizaron crías machos de 45 días de edad de madres estresadas por frío crónico durante el periodo de gestación, en su respuesta a un estímulo adrenérgico, mediante tratamiento con 1 mg/Kg/día de isoproterenol (ISO), agonista de los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ -adrenérgicos. Se observó que el grupo de animales que fueron expuestos a estrés gestacional tratados con Isoproterenol, presentó mayor porcentaje de muertes producto del tratamiento, alcanzando

una disminución del 50% de la población a los 3 días de tratamiento, mientras que el grupo control no estresado durante la gestación, presentó un 100% de sobrevivida. Junto con lo anterior, se observó un análisis morfométrico y se comparó la masa cardíaca total y la masa ventricular de las crías machos luego del tratamiento con ISO. Se observó un aumento significativo en la masa de ambos parámetros en las crías estresadas prenatalmente revelando que por lo tanto existía una respuesta hipertrófica frente a un nuevo estímulo adrenérgico en la vida postnatal (20).

#### **6.4 Programación fetal diferencial dependiendo el sexo de la cría.**

Existen evidencias desde estudios animales sobre el efecto que el estrés prenatal tiene en las crías machos y hembras, presentando diferentes fenotipos seguido de un ambiente de desarrollo fetal desfavorable. En el trabajo realizado por Ozaki et al (21), se usaron ratas hembras Wistar preñadas que fueron sometidas a un protocolo de estrés por restricción nutricional entre los días 1 al 18 de gestación. Se observó que solo las crías machos de 60 días de edad presentaban un aumento de la presión arterial, disfunción vascular y disminución del número de nefrones, siendo más susceptibles a este tipo de estrés (21).

Por otro lado, estudios en ratones C57BL, utilizando diferentes tipos de estresores durante la gestación, donde el primer tercio de gestación (1-7 días) a un estrés de constante luz, en la mitad de la gestación (8-14) a un estrés por restricción de movimiento y en la última etapa (12-21) a exposición a fuertes olores. Se observó mediante estudios epigenéticos, que las ratas machos de 10 semanas de edad presentaban un aumento en los patrones de metilación de los genes relacionados con la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en la amígdala y de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo. También, hubo aumento en la concentración de CORT plasmática, algo que no se vio en las crías hembras de estas mismas madres (22).

Esto sugiere que la respuesta adaptativa al estrés está relacionada al sexo del animal, presentando en los machos mayor susceptibilidad a cambios en el ambiente fetal.

### **6.5 Efecto del estrés en la secreción de testosterona en la vida adulta.**

En ratas machos, la testosterona es producida por las células de Leydig en los testículos y es detectable desde el día 14 de gestación. Los apropiados niveles de receptores de testosterona en los testículos son esenciales para la adecuada masculinización de las estructuras genitales externas (23). Se ha observado un marcado aumento de la producción de testosterona entre los días

18-19 de gestación, los cuales se relacionan con el periodo de diferenciación sexual del cerebro, periodo crítico que establece los patrones de secreción de gonadotropina y comportamiento sexual en la edad adulta (24). Se ha descrito que una concentración insuficiente de andrógeno en este periodo podría conducir a una feminización del cerebro y una alteración en la secreción de testosterona en la edad adulta.

Mediante un estudio utilizando las crías machos de ratas Wistar sometidas a un estrés de restricción de movimiento 3 veces al día por 45 minutos, entre los días 14-21 de gestación. Se observó una disminución de la distancia anogenital del grupo estrés medido entre los días 10-21 postnatal, también una disminución en la concentración de LH y FSH a los 28 días de edad. Del mismo modo se midió la concentración de testosterona entre los días 20 al 75 postnatal y se observó que a pesar que tenían igual patrones de secreción que sus respectivos controles, existía una marcada disminución en su concentración de testosterona (25).

Además, se mostró el efecto de la concentración de testosterona y el desarrollo de patologías cardíacas, en ese sentido, un estudio de cohorte retrospectivo a 129 pacientes de sexo masculino entre 43-72 años de edad, que

presentan enfermedad arterial coronaria. Se demostró la inversa relación que existe entre los niveles de testosterona plasmático y la severidad en la arterosclerosis coronaria en estos pacientes, revelando que al presentar una menor concentración de testosterona se correlaciona con un mayor grado de obstrucción coronaria, lo que sugiere que la baja concentración de testosterona puede ser un factor de riesgo para padecer enfermedades cardiovasculares en el sexo masculino (26).

Considerando las evidencias de la literatura que señalan que el estrés simpático durante la gestación provoca un aumento en la concentración de NA en el ambiente fetal, y como este afecta la función cardíaca durante el desarrollo de la progenie. De igual manera que el estrés fetal provoca cambios en los patrones de secreción de testosterona, causando una disminución en su concentración en la vida adulta agravando patologías cardíacas, planteamos la siguiente hipótesis.

## **HIPÓTESIS**

La exposición a estrés crónico por frío durante la gestación disminuye la concentración plasmática de testosterona, los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos y los niveles de noradrenalina cardíacos de las ratas machos de la descendencia.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar el efecto de la exposición a estrés por frío durante la gestación en la concentración de receptores  $\beta$ -adrenérgicos y las concentraciones de noradrenalina cardíacos y testosterona plasmática en las crías macho a los 20 y 60 días de edad.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Objetivo Específico 1. Cuantificar las concentraciones de testosterona y AMH plasmática en las crías machos a los 20 y 60 días de edad.

Objetivo Específico 2. Determinar la concentración de corticosterona y noradrenalina plasmáticos y cardíaco de las crías machos a los 20 y 60 días de edad.

Objetivo Específico 3. Determinar la concentración de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el corazón y el efecto del estrés gestacional sobre el peso del corazón de las crías machos a los 20 y 60 días de edad.

## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Animales**

Se utilizaron 20 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley con un peso entre 250 y 300 g del Bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile, las cuales fueron mantenidas en condiciones regulares de luz (12 horas de luz y 12 horas de oscuridad) y temperatura (21-23°C), con acceso libre a agua y alimento.

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).

#### **7.1.2 Preñez controlada**

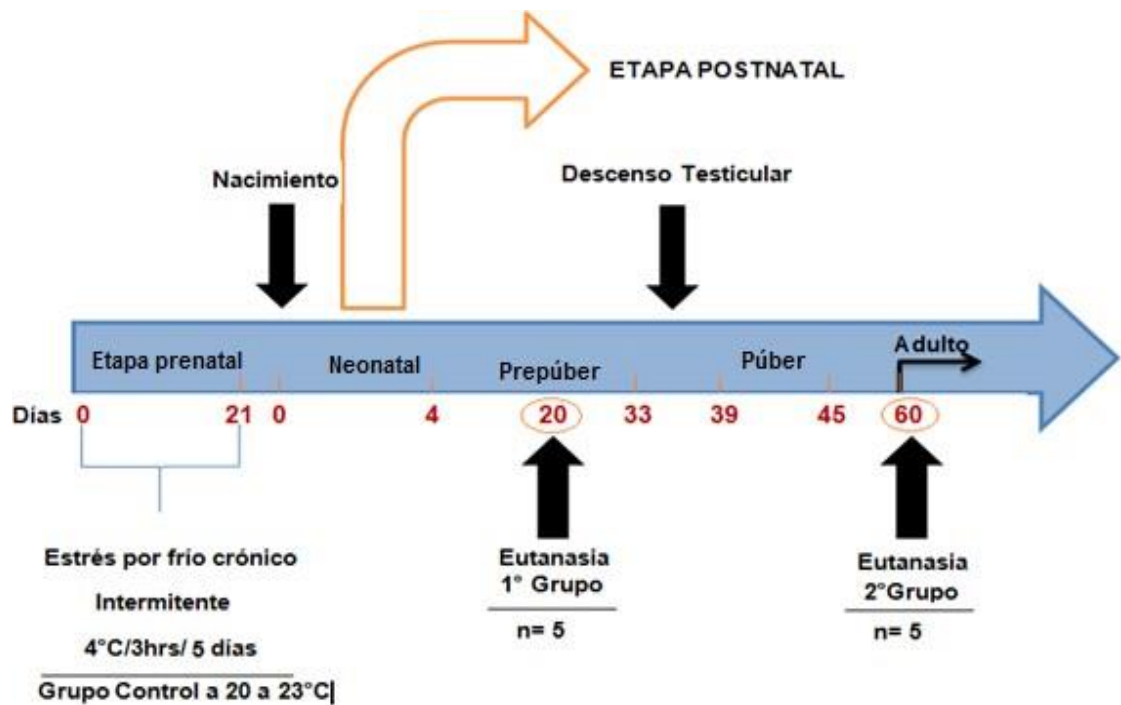
a. Las ratas utilizadas se les realizó diariamente un frotis vaginal, para evaluar en qué etapa del ciclo estral se encontraban. Al observarse la aparición de la etapa proestro en el frotis vaginal, y con el fin de determinar la receptividad de la hembra hacia el macho, se dejó a la hembra con un rata macho, de fertilidad comprobada, durante la noche. Al siguiente día se volvió a



realizar un frotis vaginal en la hembra para evaluar la presencia de espermatozoides, en caso de observar, se consideró este como día cero de gestación.

**b.** Las hembras preñadas fueron divididas en dos grupos experimentales, cada uno de 10 ratas: a.-Un grupo control, el cual fue mantenido a una temperatura regular de 20°C durante todo el periodo de gestación, y b.- un grupo estrés que fue sometido a un protocolo de estrés por frío crónico intermitente, el cual consistió en exponer a la rata preñada durante todo el periodo de gestación (21 días) a una temperatura de 4°C por 3 horas diarias, 5 días a la semana.

Al finalizar el periodo de gestación, las crías de ambos grupos control y estrés fueron divididas en dos grupos, cada uno compuesto de 5 ratas. En el primer grupo las crías fueron eutanasiadas a los 20 días de edad, durante su etapa de desarrollo prepúber, y en el segundo grupo fueron eutanasiadas a los 60 días de edad, en su etapa de desarrollo adulta (Figura 1). Los animales fueron eutanasiados mediante decapitación con guillotina. Posterior a eso, se recolectó la sangre, para obtener el plasma sanguíneo, y se extrajeron los corazones, los cuales fueron inmediatamente pesados y almacenados a -80°C hasta el momento de su utilización. Para efectos de este trabajo solo las crías machos fueron estudiadas.



**Figura 1. Protocolo grupo control y estrés por frío.** Las hembras fueron cruzadas, siendo considerado como día cero, el día inicial de la preñez con un frotis vaginal positivo para espermatozoides, se dividieron en grupo control y grupo por estrés (n=5 en cada grupo). Tras el nacimiento de las crías fueron aleatorizados entre grupo prepúber y adulto, sacrificados en los días señalados en la figura. Para cada grupo experimental, existió un grupo control con n=5 para cada uno.

## **7.2 Determinación de Corticosterona (CORT), Testosterona y Hormona anti-mülleriana (AMH).**

Las siguientes hormonas fueron determinadas a través del método ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se cuantificaron los niveles plasmáticos de CORT con un kit ELISA (55-CORMS-E01, ALPCO, número de lote 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 cuantificaron los niveles plasmáticos de Testosterona con un kit ELISA (11-TESHU-E01, ALPCO, número de lote 170550). La sensibilidad de este kit es de 0,022 ng/mL, presentando reactividad cruzada con androsterona 0,1%, androstediona 0,8% y 0,5% con progesterona. La variabilidad intra ensayo es de menos de 9,6% y la variabilidad inter ensayo es de menos de 6,1%.

Se cuantificó los niveles plasmáticos de AMH con un kit de ELISA (CSB-E11162r, CUSABIO, número de lote V111). La sensibilidad de este kit es de 0,1 ng/mL, no presenta significativa reactividad cruzada entre análogos de AMH, lo

que hace que el ensayo presente alta afinidad y sensibilidad para la detección de AMH. La variabilidad intra ensayo es de menos de 15% y la variabilidad inter ensayo es de menos de 15%.

### **7.3 Cuantificación de noradrenalina por kit de ELISA**

La sensibilidad de este kit es de 0,1 ng/ml presenta reactividad cruzada con 100% de análogos de NA, 0,14% con derivados de A, 0,2% con derivados de dopamina, 0,48% normetanefrina. La variabilidad intra ensayo es de menos de 11,7% y la variabilidad inter ensayo es de menos de 10,7%. Se cuantificó siguiendo las instrucciones del fabricante, kit ELISA BA E-5200, ImmuSmol, lote número 170315.

#### **Noradrenalina en plasma**

Para cuantificar NA en plasma sanguíneo se utilizaron aproximadamente 10 µL de plasma, el cual fue diluido 10 veces con amortiguador de dilución (HCl 0,01 N, EDTA 1 mM y Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 4 mM), para asegurar que la muestra este dentro del rango de detección del kit ELISA.

#### **Noradrenalina en corazón**

Previo a la determinación de NA se pesaron aproximadamente 30 mg de corazón y se procedió a homogenizar en vidrio-vidrio utilizando amortiguador de

dilución, siempre en hielo. El homogenizado se centrifugó a 12.000 rpm a 4°C por 10 minutos y se recuperó el sobrenadante, el cual fue diluido 20 veces con amortiguador de dilución para su determinación por kit ELISA.

#### **7.4 Determinación de Receptores $\beta_1$ y $\beta_2$ -adrenérgicos cardíacos mediante Western Blot.**

##### **Extracción proteica**

Se pesaron aproximadamente 100 mg de tejido cardíaco, el cual fue homogenizado en vidrio-vidrio utilizando amortiguador RIPA (Tris-HCl pH 7,2 10 mM, Tritón X-100 1%, NaCl 150 mM, SDS 0,1%), proceso realizado en hielo. El producto obtenido se centrifugó a 13000 rpm por 20 minutos a 4°C. Se descartó el pellet y se recuperó el sobrenadante, midiéndose posteriormente la concentración de proteínas a través del método de Bradford (27).

##### **Electroforesis en geles de poliacrilamida**

La separación de las proteínas se basa en su masa molecular, mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Para todos los geles se cargaron 20  $\mu$ g de proteínas, previamente calentadas a 65°C por 10 minutos. Tanto para la determinación del receptor  $\beta_1$  como para  $\beta_2$ -adrenérgicos cardíacos se utilizó un gel separador al 10% y un gel concentrador al 5%. La electroforesis se realizó a

un voltaje constante de 120 V en amortiguador de electroforesis 1X (Tris-Base 0,3% (p/v), glicina 1,44% (p/v), SDS 0,1% (p/v); pH 8,6) durante 90 minutos.

### **Electrotransferencia de proteínas**

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de poros de 0,45  $\mu\text{m}$  a 400 mA constante durante 90 minutos en amortiguador de transferencia (Tris-Base 0,5% (p/v), glicina 2,4% (p/v), metanol 20% (v/v)). Luego completada la transferencia, se procedió a teñir la membrana con Rojo Ponceau al 5% para verificar la correcta transferencia. Posteriormente, se eliminó la tinción con lavados con agua de la llave y se procedió a realizar 3 lavados con TBST 0,1% (Tris-Base 0,224% (p/v), NaCl 0,8% (p/v), Tween 20 0,1% (v/v), ajustar a pH 7,6), cada uno por 5 minutos.

### ***Western blot***

Las membranas de nitrocelulosa se incubaron en agitación suave con 5% de leche en TBST 0,1% a temperatura ambiente, con el fin de bloquear los sitios de unión inespecíficos. Se realizaron tres lavados con TBST 0,1%, cada uno por 5 minutos, y posteriormente se incubó toda la noche a 4°C con anticuerpos

primario para el receptor  $\beta_1$  o  $\beta_2$ -adrenérgico utilizando una dilución de 1:3000 y 1:2500 respectivamente; ambos anticuerpos diluidos en TBST 0,1% y 5% de leche para evitar uniones inespecíficas. Posterior a la incubación, la membrana se lavó 3 veces por 5 minutos con TBST 0,1% y se incubó durante 1 hora, con agitación y a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario en ambas condiciones utilizando una dilución de 1:10.000 en TBST 0,1%. Se lavó 3 veces la membrana, 5 minutos cada vez, y se procedió a revelar.

Utilizando el sistema GeneSys G-Box (Syngene Headquarters, Frederick, MD, USA) se realizó el revelado por quimioluminiscencia utilizando el reactivo EZ-ECL. Como control de carga se utilizó GAPDH, una proteína altamente conservada y presente en cantidades similares, independiente del tipo de muestra. El anticuerpo primario fue incubado por 1 hora utilizando una dilución de 1:40.000, y posteriormente se incubó con un anticuerpo secundario anti-rabbit incubado en 1:10.000 durante 45 minutos. En la Tabla 1 se muestra un resumen de los anticuerpos mencionados con sus respectivas diluciones. La intensidad de las bandas se evaluó utilizando el programa ImageJ.



**Tabla 1.** Detalle de anticuerpos utilizados.

Anticuerpo	Tipo de anticuerpo	Característica	Laboratorio	Dilución
ADRB1	Primario	Policlonal	ABCAM	1:3.000
ADRB2	Primario	Monoclonal	ABCAM	1:2.500
GAPDH	Primario	Policlonal	SIGMA	1:40.000
Anti-Rabbit	Secundario	Policlonal	ABCAM	1:10.000

### **7.5 Análisis estadístico.**

Los resultados se expresaron como promedio  $\pm$  SEM (n=5 animales independientes). Para analizar los datos de dos grupos distintos se utilizó la prueba de *t-Student* no pareado. Cuando se compararon tres o más grupos se utilizaron un análisis de ANOVA de una vía. Se estableció como nivel de significancia en ambos casos con un  $p < 0.05$ .

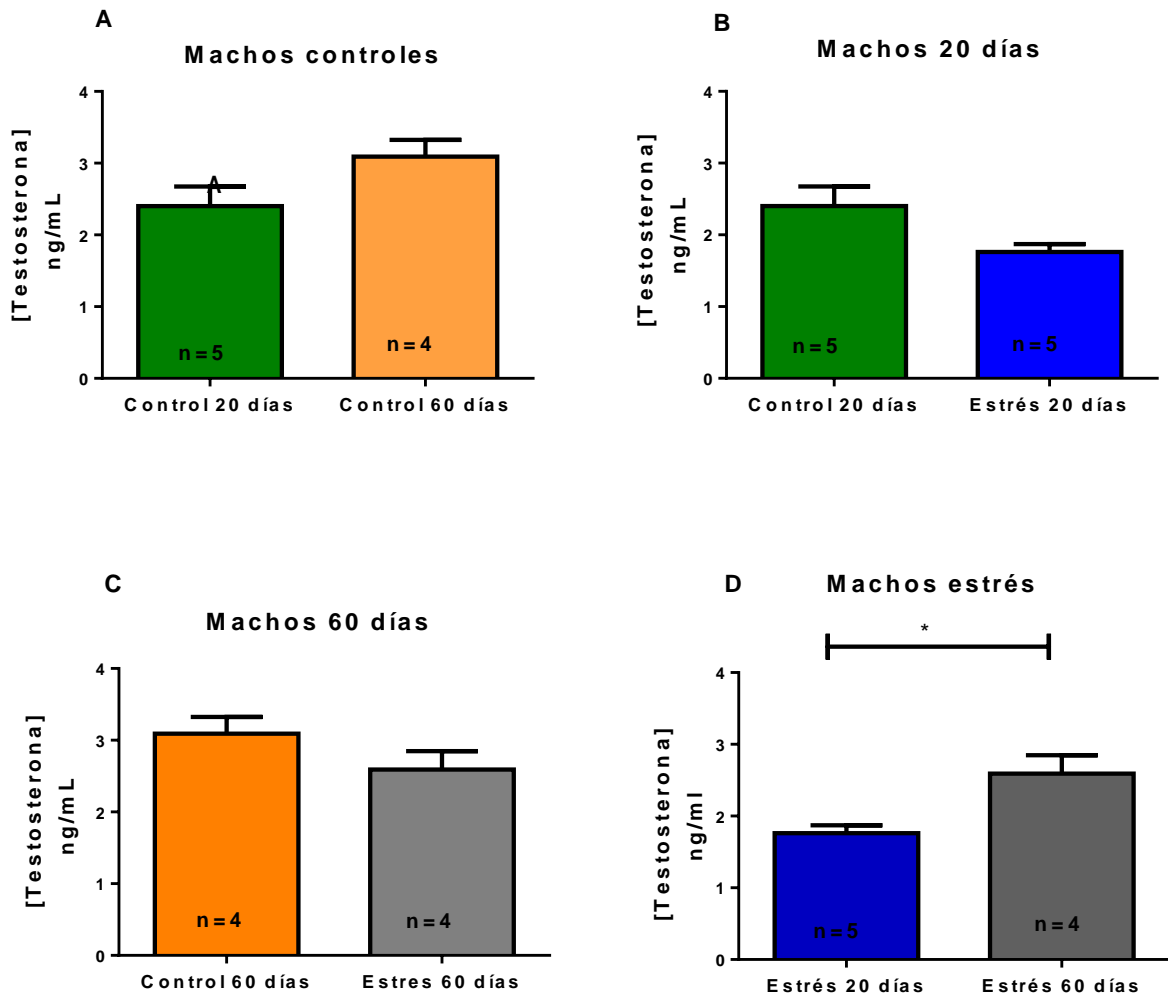
## **8. RESULTADOS**

**Objetivo específico 1: Cuantificar los niveles de Testosterona y AMH plasmática en las crías machos a los 20 y 60 días de edad.**

### **8.1 Concentración de testosterona plasmática.**

Se midió la concentración de testosterona presente en el plasma de las crías machos para ver el efecto del estrés gestacional en el eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas al comparar ambos grupos controles (Figura 2A), ni entre los grupos de estrés con sus respectivos controles a los 20 (Figura 2B) y 60 (Figura 2C) días de edad.

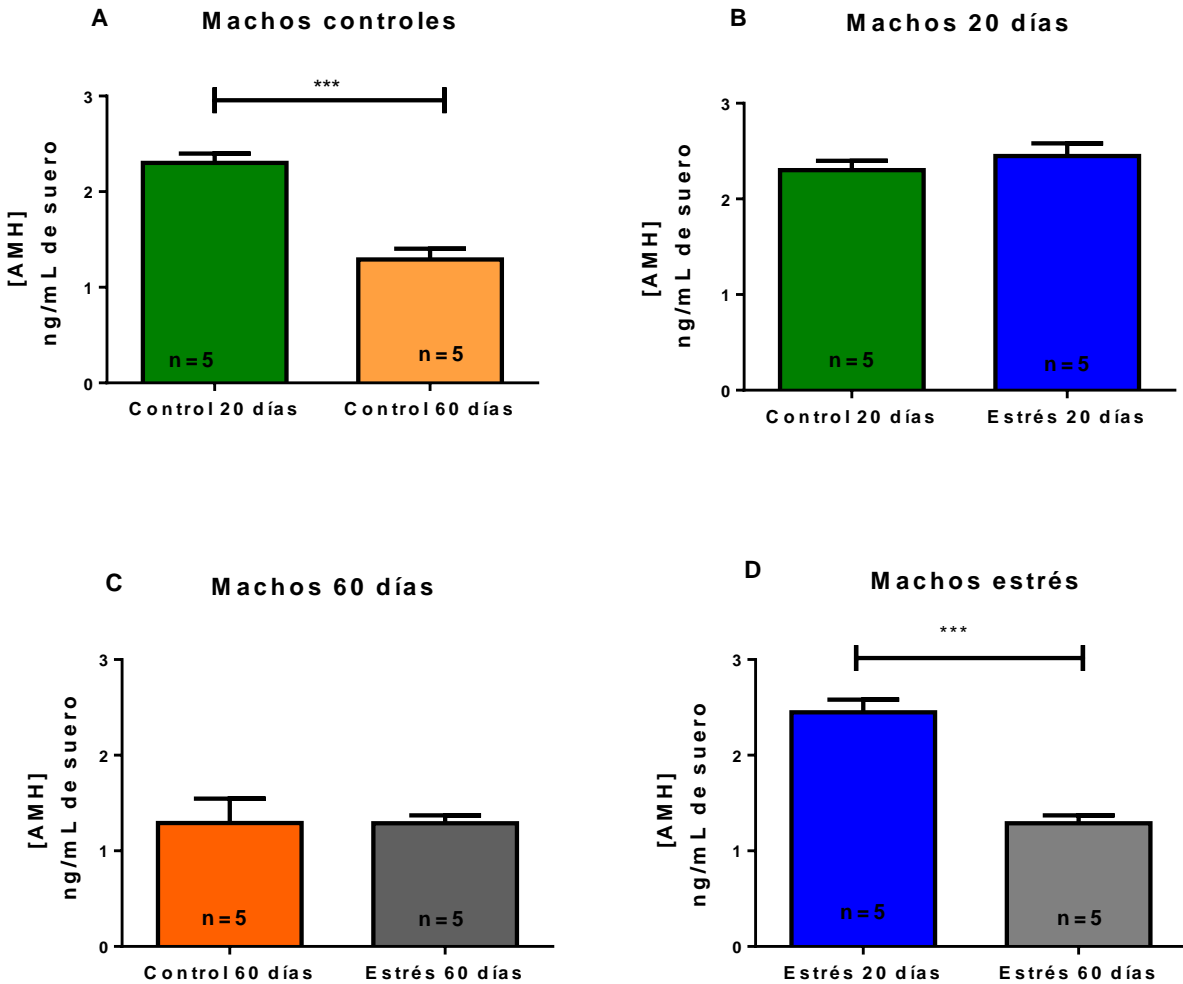


**Figura 2. Concentración de Testosterona plasmática en crías machos.** (A) En el plasma de animales controles. (B) En el plasma de animales de 20 días de edad. (C) En el plasma de animales de 60 días. (D) En el plasma de animales estrés. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar medio (n = 5). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de t-Student.

## **8.2 Concentración de AMH plasmática.**

Se sabe que en ratas al comienzo de la pubertad, el aumento de testosterona intratesticular ejerce un fuerte efecto inhibitorio sobre la producción de AMH (28). Debido a esto, se midió la concentración de AMH presente en el plasma sanguíneo de las crías macho.

Al analizar los niveles presentes en los animales de los grupos control, se observó una disminución significativa de AMH plasmática a los 60 días de edad v/s los 20 días de edad ( $1,291 \pm 0,1138$  v/s  $2,300 \pm 0,09790$ ,  $p=0,001$ ) (Figura 3A). No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos de estrés y sus respectivos grupos control (Figura 3B y 3C) Al comparar ambos grupos estrés, se observó una disminución significativa a los 60 días de edad v/s los 20 días de edad ( $1,289 \pm 0,08240$  v/s  $2,449 \pm 0,1312$ ,  $p= 0,001$ ) (Figura 3D).

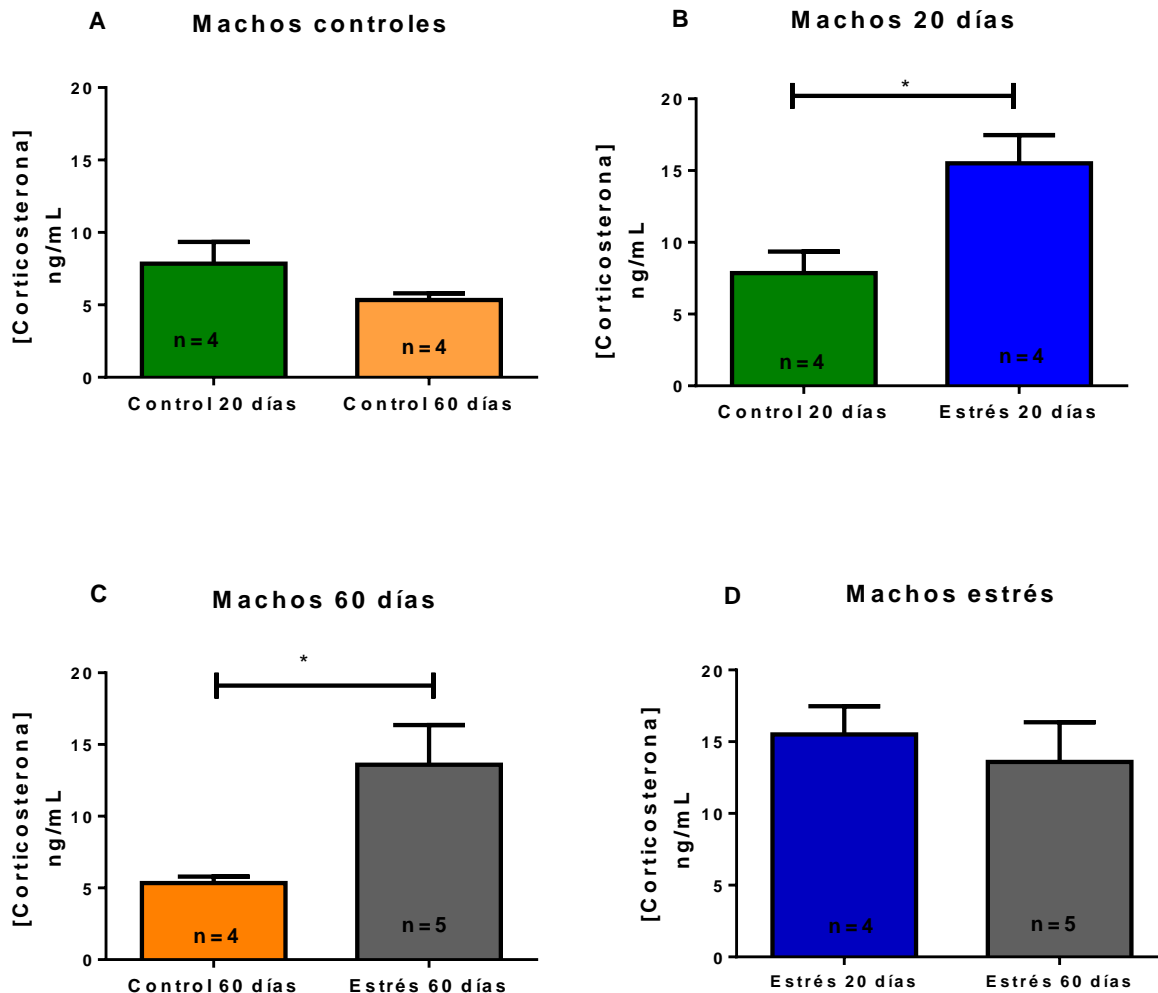


**Figura 3. Concentración de AMH plasmática en crías machos.** (A) En el plasma de animales controles. (B) En el plasma de animales de 20 días de edad. (C) En el plasma de animales de 60 días de edad. (D) En el plasma de animales estrés. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar medio (n = 5). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de *t-Student*. \*\*\* $p < 0,001$ .

**Objetivo específico 2: Determinar la concentración de corticosterona y noradrenalina plasmática de las crías machos a los 20 y 60 días de edad.**

### **8.3 Concentración de corticosterona plasmática.**

Se determinó la concentración de CORT en crías machos para ver el efecto del estrés materno en la programación del eje HHA. No se observaron diferencias entre las distintas edades en los grupos control (Figura 4A). Por otro lado, al comparar a los grupos estrés v/s grupos controles, se observó un aumento significativo en la concentración de CORT en los grupos estrés, tanto a los 20 días ( $15,52 \pm 1,966$  v/s  $7,850 \pm 1,502$   $p= 0,05$ ) como a los 60 días ( $13,59 \pm 2,767$  v/s  $5,337 \pm 0,4600$ ,  $p= 0,05$ ) (Figura 4B y 4C).



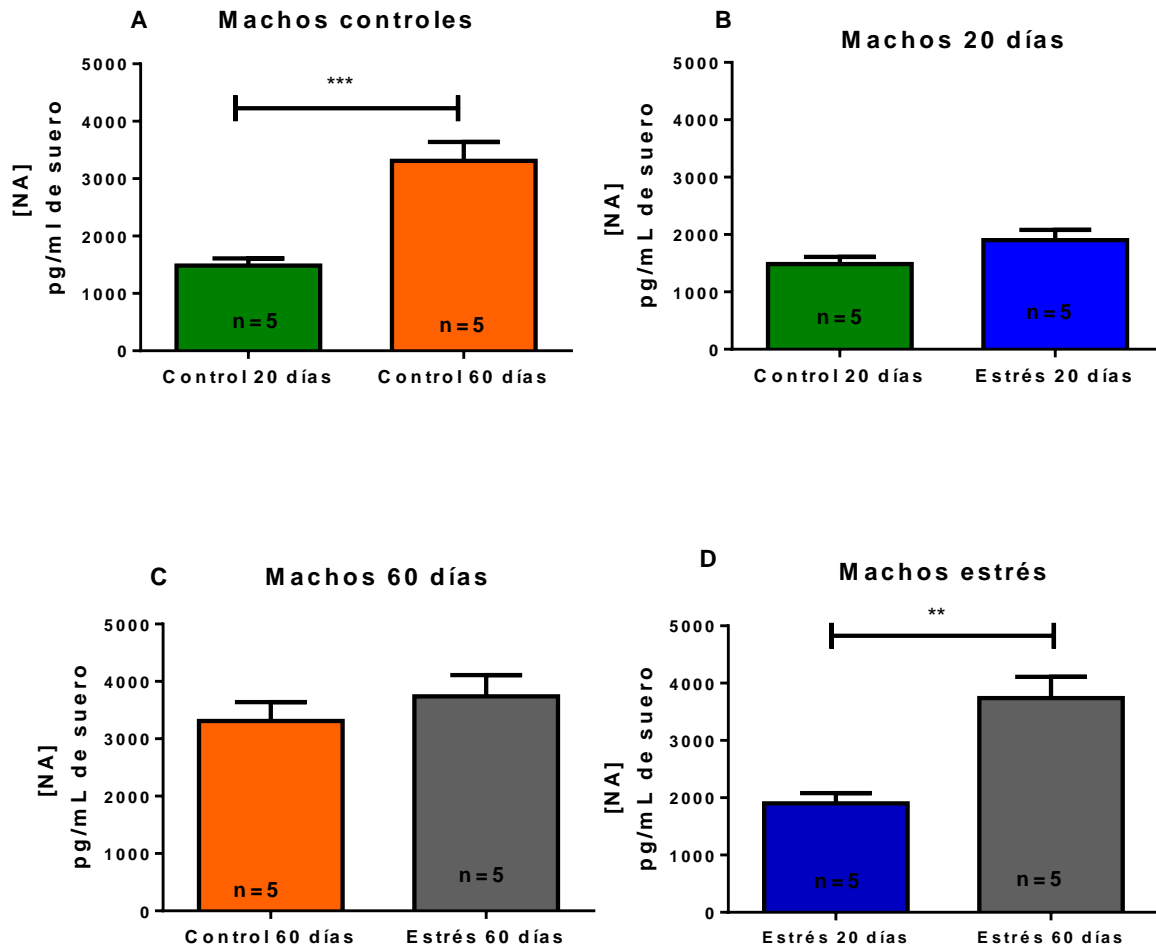
**Figura 4. Concentración de corticosterona plasmática de crías machos.** (A) En el plasma de animales controles. (B) En el plasma de animales de 20 días de edad. (C) En el plasma de animales de 60 días. (D) En el plasma de animales estrés. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar medio (n = 5). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de *t-Student*. \* $p < 0,05$ .



#### **8.4 Concentración de noradrenalina plasmática.**

Se determinaron los niveles plasmáticos de NA en ambos grupos estrés y sus respectivos controles mediante ELISA.

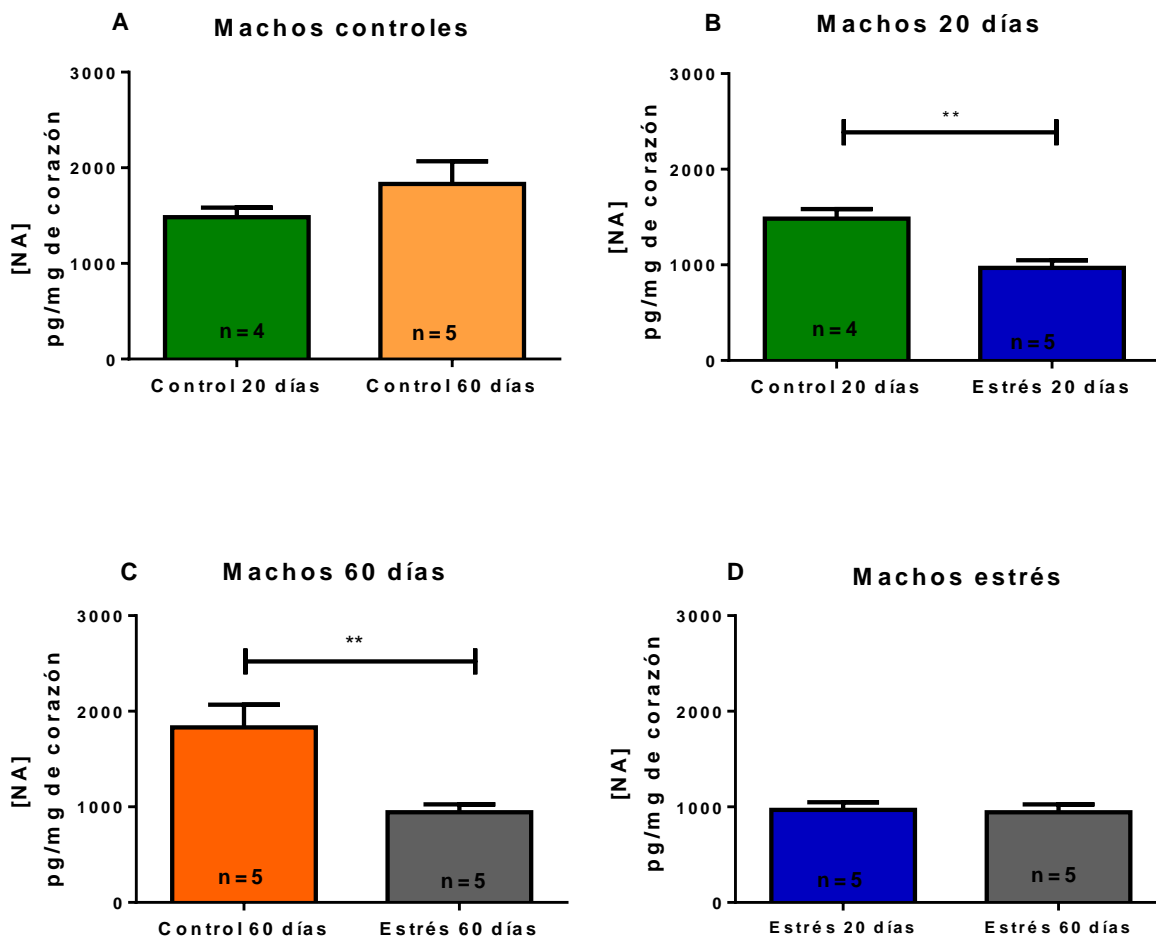
En animales controles, se observó que a los 60 días de edad presentan mayor concentración de NA que a los 20 días de edad ( $3309 \pm 332,5$  v/s  $1487 \pm 123,9$ ,  $p= 0,001$ ) (Figura 5A), resultado esperado, ya que la concentración plasmática de noradrenalina, tanto basal como en respuesta a estímulos, aumenta con la edad. Sin embargo, el grupo de ratas estresadas no presentaron cambios respecto a sus respectivos controles (Figura 5B y 5C). Al comparar ambos grupos estrés, se observó un aumento significativo a los 60 días v/s 20 días ( $3741 \pm 369,3$  v/s  $1904 \pm 175,8$ ,  $p= 0.01$ ) (Figura 5D).



**Figura 5. Concentración de NA plasmática de crías machos. (A)** En suero de animales controles. **(B)** En suero de animales de 20 días de edad. **(C)** En suero de animales de 60 días de edad. **(D)** En suero de animales estrés. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar medio ( $n = 5$ ). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de *t-Student*. \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ .

### **8.5 Concentración de noradrenalina cardíaca.**

Se cuantificaron los niveles de NA en el corazón de crías machos controles y los estresados in útero cuando tenían 20 y 60 días de edad mediante ELISA. Al comparar ambas edades en los animales controles no se observaron diferencias en las concentraciones de NA cardíacas (Figura 6A). Sin embargo, los animales estresados presentaron una disminución en las concentraciones de NA v/s sus controles, tanto a los 20 ( $969,2 \pm 78,36$  v/s  $1483 \pm 100,5$ ,  $p=0,01$ ), como a los 60 días de edad ( $944,1 \pm 83,28$  v/s  $1832 \pm 236,5$ ,  $p=0,01$ ). (Figura 6B y 6C).



**Figura 6. Concentración de NA en el corazón de crías machos. (A)** En corazón de animales controles. **(B)** En corazón de animales de 20 días de edad. **(C)** En corazón de animales de 60 días de edad. **(D)** En corazón de animales estrés. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar medio ( $n = 5$ ). Para el análisis estadístico se utilizó la prueba de *t-Student*. **\*\* $p < 0,01$** .

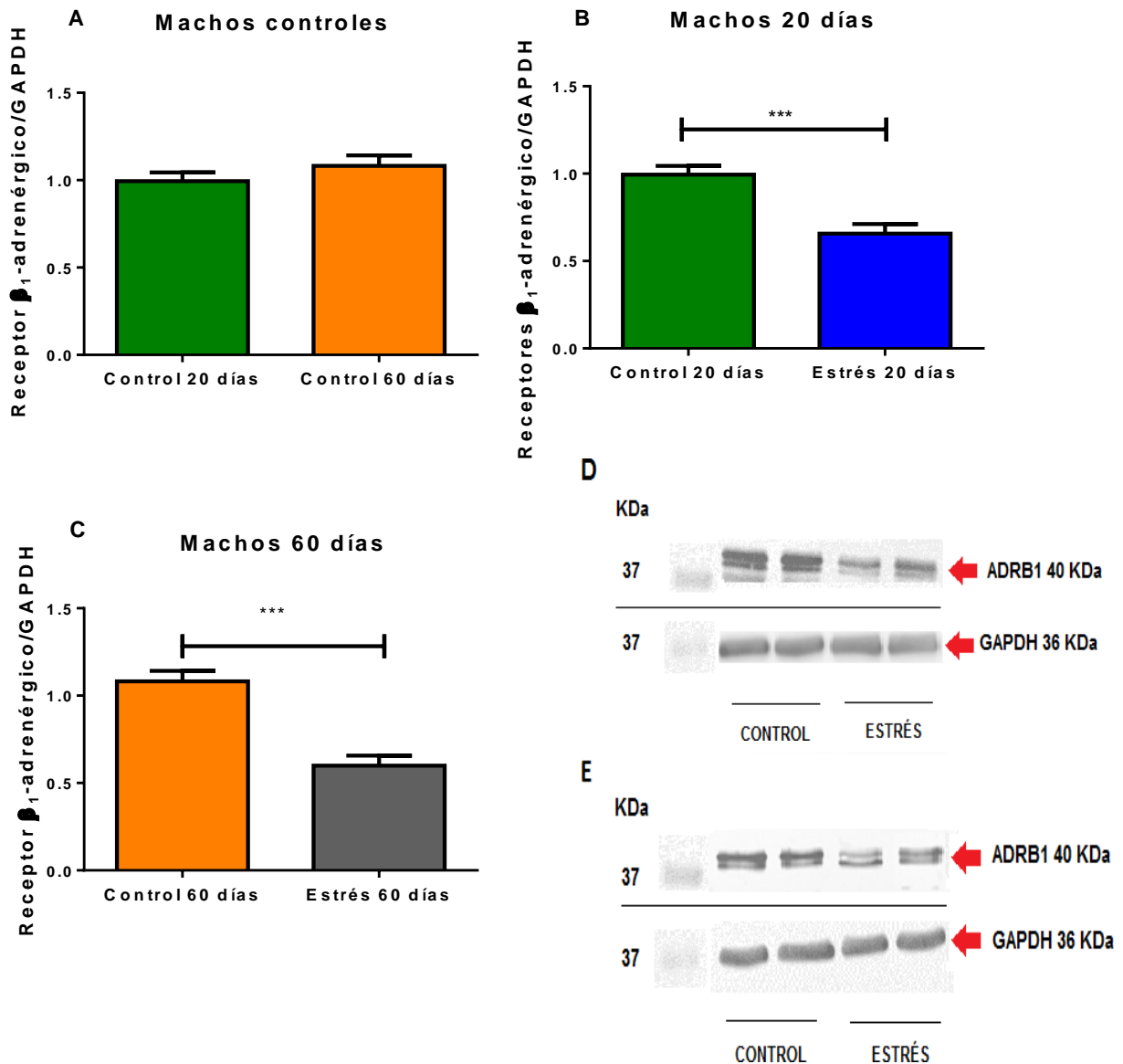
**Objetivo específico 3: Determinar las concentraciones de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en el corazón y el efecto del estrés gestacional sobre el peso del corazón de las crías machos a los 20 y 60 días de edad.**

En estudios previos de nuestro laboratorio, se determinó que las madres expuestas a estrés por frío durante la gestación presentan un aumento en la concentración de NA plasmática, junto con una disminución en la funcionalidad del NET placentario (17), causando por lo tanto que el feto se vea expuesto a altas concentraciones de NA durante su desarrollo. Por lo anterior, se decidió evaluar qué ocurre con los receptores  $\beta_1$  y  $\beta_2$ -adrenérgicos a nivel cardíaco, órgano blanco del SNS. La determinación se realizó a través de western blot.

Debido a que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la vida fetal modulan la expresión de factores de crecimiento, promoviendo el crecimiento y diferenciación de los cardiomiocitos (29), también se pesaron los corazones de las crías machos los 20 y 60 días de edad. A pesar que esta medición no entrega información directa de hipertrofia, ya que para eso se debe complementar con un marcador específico como la cadena pesada de  $\beta$ -miosina ( $\beta$ -MHC), una variación en el peso de los corazones nos puede dar una aproximación de aquello.

## **8.6 Cuantificación de receptor $\beta_1$ -adrenérgico cardíaco.**

No se observaron diferencias en la cuantificación de la proteína del receptor  $\beta_1$ -adrenérgico (ADRB1) en los corazones de las crías machos controles comparándolos por edad (Figura 7A). Sin embargo, se observó una disminución de la proteína en el grupo estrés v/s sus respectivos grupos controles, tanto a los 20 ( $0,6563 \pm 0,05578$  v/s  $0,9940 \pm 0,05040$ ,  $p= 0,001$ ) (Figura 7B) y 60 días de edad ( $0,5993 \pm 0,05785$  v/s  $1,082 \pm 0,05937$ ,  $p= 0,001$ ) (Figura 7C).

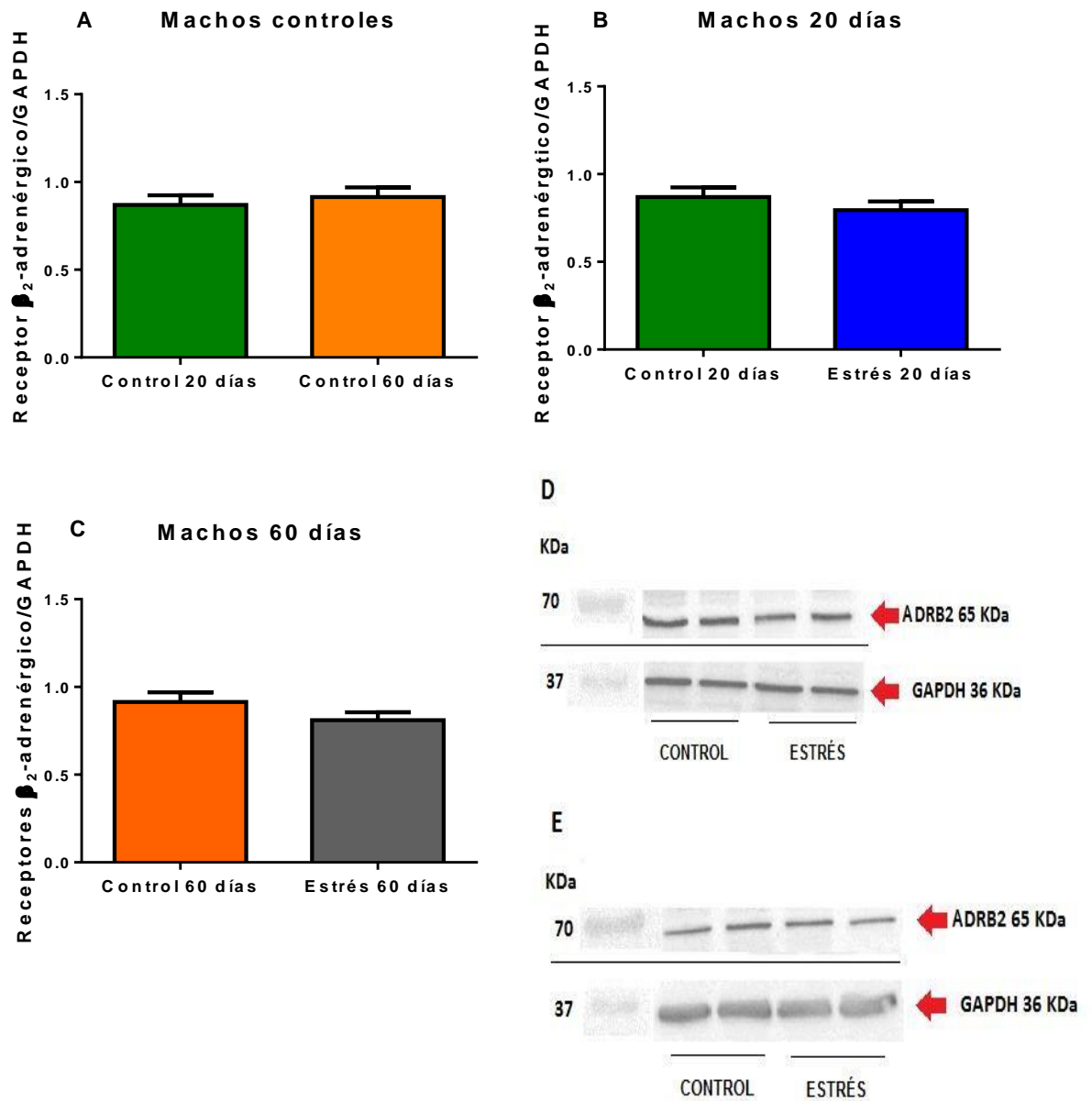


**Figura 7. Receptor  $\beta_1$ -adrenérgico cardíaco en corazones de crías machos controles y estrés.** (A)-Cuantificación de la proteína de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos obtenidos a través de western blot en corazones de crías machos controles y estrés de (B) 20 días y (C) 60 días de edad, con sus membranas representativas de western blot de (D) 20 días y (E) 60 días edad. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes y corresponden al promedio  $\pm$  error estándar medio (n=5). En los tres casos se utilizó un análisis de *t-Student*. \*\*\* $p < 0,001$ .

### **8.7 Cuantificación de receptor $\beta_2$ -adrenérgico cardíaco.**

No se observó diferencia en la proteína del receptor  $\beta_2$ -adrenérgico (ADRB2) en los corazones de las crías machos controles (Figura 8A) ni en los grupos estrés de 20 (Figura 8B) y 60 días de edad (Figura 8C).

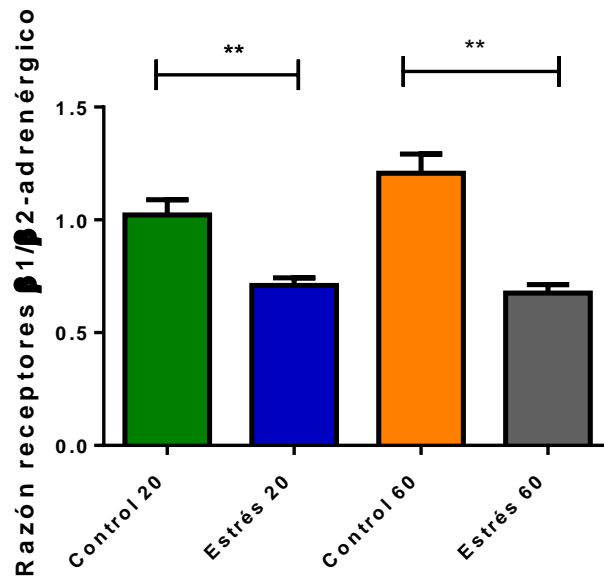




**Figura 8. Receptor  $\beta_2$ -adrenérgicos cardíaco en corazones de crías machos controles y estrés.** (A) Cuantificación de la proteína de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos obtenidos a través de western blot en corazones de crías machos controles y estrés de (B) 20 días y (C) 60 días de edad, con sus membranas representativas del western blot de (D) 20 días y (E) 60 días de edad. Los resultados fueron obtenidos de tres experimentos independientes y corresponden al promedio  $\pm$  error estándar medio (n=5). En los tres casos se utilizó un análisis de *t-Student*.

### **8.8 Razón de receptores $\beta_1/\beta_2$ –adrenérgico cardíaco.**

Luego de analizar la concentración de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgico y  $\beta_2$ -adrenérgico, se quiso evaluar además la razón entre los receptores  $\beta_1/\beta_2$ -adrenérgico para evaluar posibles cambios en la proporción de estos receptores (Figura 9). Se observó una disminución significativa en la razón de los receptores  $\beta_1/\beta_2$ -adrenérgicos del grupo estrés con respecto a su control a los 20 ( $0,7099 \pm 0,03334$  v/s  $1,022 \pm 0,06794$ ,  $p= 0,01$ ) y 60 días ( $0,6750 \pm 0,03775$  v/s  $1,207 \pm 0,08480$ ,  $p= 0.01$ ).

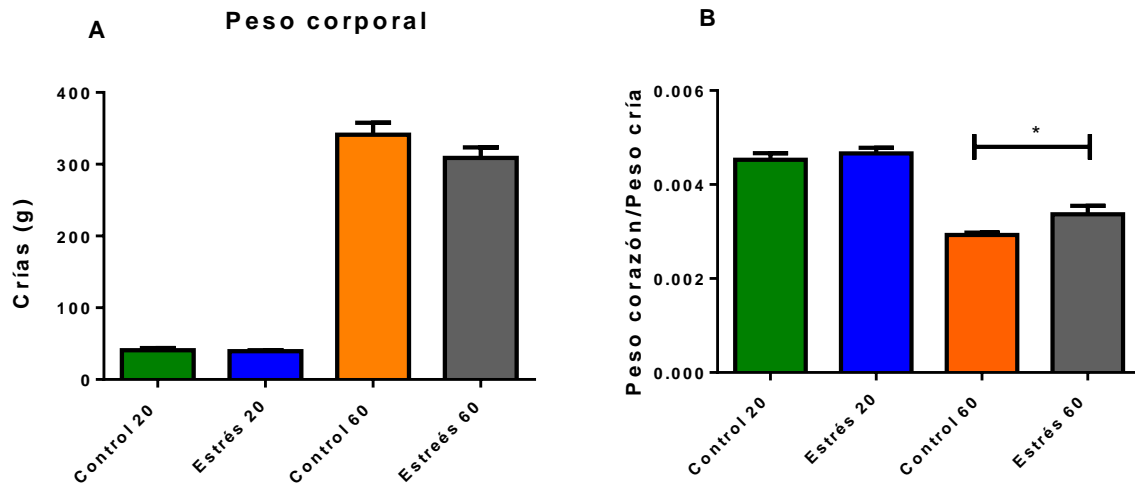


**Figura 9. Razón receptores  $\beta_1/\beta_2$ -adrenérgico en los corazones de las crías machos controles y estrés de 20 y 60 días de edad.** Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar medio. Se utilizó un análisis de ANOVA de una vía. Cada grupo consta de 5 animales. **\*\* $p < 0,01$ .**

### **8.9 Razón entre el peso de los corazones y peso corporal de las crías machos.**

Para evaluar si el estrés por frío tiene una influencia directa sobre el peso del corazón de las crías, se determinó el peso corporal de las crías a los 20 y 60 días de edad (Figura 10A) y se utilizó para normalizar el peso de los corazones de las crías (Figura 10B).

No se observaron cambios en los pesos corporales entre el grupo control y el grupo estrés en las crías, tanto a los 20 como 60 días de edad (Figura 10A). Solo en los corazones de las crías estrés de 60 días de edad se observó un aumento significativo en su peso en comparación al grupo control ( $0,003367 \pm 0,0001829$  v/s  $0,002930 \pm 4,921e-005$ ,  $p= 0,05$ ) (Figura 10B). Las crías de 20 días no presentaron variación significativa respecto a su control.



**Figura 10. Peso de las crías machos y de sus corazones a distintas edades. (A)** Peso de las crías machos estrés y controles a los 20 y 60 días de edad. **(B)** Razón del peso de los corazones/peso de las crías machos controles y estrés a los 20 y 60 días de edad. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  error estándar medio. En ambos casos se utilizó un análisis de *t-Student*. Cada grupo consta de 5 animales. \* $p < 0,05$ .

## 9. DISCUSIÓN

El protocolo de estrés por frío utilizado en este trabajo está clasificado como un protocolo de estrés simpático (10), ya que activa exclusivamente al SNS, produciendo como consecuencia la liberación de NA, sin producir cambios en la concentración de ACTH y A, lo que indica la no activación del eje HHA (15). En este trabajo se estudió si la activación simpática crónica durante la gestación produce cambios (proceso conocido como programación fetal) en los machos de la descendencia de las madres expuestas a este estrés. Para ello analizamos el efecto en tres ejes que normalmente están involucrados en la programación fetal:

1. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal
2. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal
3. Eje Neural-Simpático

Es claro el rol que cumple la placenta durante el embarazo, ya que participa activamente en el transporte de nutrientes al feto, tiene efectos directos o indirectos en la función cardiovascular fetal y tiene influencia endocrina en el

feto en desarrollo (30). Como tal, una placenta que funciona correctamente es crucial para un desarrollo normal del feto, ya que entre los roles que presenta la placenta, es un mediador del ambiente materno y el feto. Un entorno materno alterado puede inducir cambios en el desarrollo fetal y puede tener consecuencias importantes, como riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares, endocrinas y/o metabólicas en la edad adulta (31). Por ejemplo, en humanos los embarazos complicados por desnutrición o una dieta baja en proteínas, provocan alteraciones en los patrones normales de desarrollo placentario. Entre ellas causa una interrupción del periodo de angiogénesis placentaria, produciendo la disminución del crecimiento y diferenciación del trofoblasto, lo que a su vez implica reducción en la expresión y/o actividad de transportadores y enzimas placentarias. Por ejemplo, la enzima  $11\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 ( $11\beta$ -HSD2), encargada de inactivar la CORT, protegiendo al feto de los glucocorticoides materno, si se llega a producir una disminución de la enzima, aumentaría la concentración de CORT en el ambiente fetal, causando efectos deletéreos en la descendencia, como bajo peso al nacer, el desarrollo de intolerancia a la glucosa e hipertensión arterial en la edad adulta (32).

Por otro lado, se ha probado que el grado de susceptibilidad del organismo a un ambiente fetal desfavorable, es género específico, indicando que

generalmente los machos son más vulnerables a cambios en el ambiente fetal que las hembras, las cuales parecieran estar protegidas durante la gestación. Así por ejemplo, en modelos de restricción nutricional moderada en ratas gestantes, han mostrado que solo las crías machos presentan un aumento en la presión arterial y anomalías en la función vascular. Similares resultados se han visto en modelos de restricción moderada de proteínas, hipoxia y tratamiento con Dexametasona durante la gestación, en donde en todos los casos mencionados, el macho se ve mayormente afectado que las hembras y solo cuando el modelo de restricción fueron severos, se detectó aumento en la presión arterial también en las hembras, (33), (34).

Por lo anterior, se decidió trabajar solo con la descendencia macho para estudiar los efectos del estrés crónico por frío durante la gestación y su manifestación postnatal en dos grupos representativos de 20 y 60 días de edad, edades elegidas por representar dos estadios de desarrollo de la rata (prepúber y adulta).

### **9.1 Etapa prenatal**

En trabajos previos del laboratorio, se estudió el efecto de la exposición a estrés crónico por frío en las madres gestantes, demostrando que las madres estresadas presentaban una sobreactivación del SNS, con su concomitante



aumento de NA plasmático. Se detectó también la activación del eje HHA por la elevada concentración de CORT plasmática, algo que no fue observado en animales no gestantes sometidos a este mismo protocolo de estrés (17). Además, se analizó la funcionalidad NET placentario, clave en estas circunstancias, ya que es el encargado de mantener baja la concentración de NA en la circulación útero-placentar (35), se observó que efectivamente el estrés estaría provocando una disminución en la funcionalidad de NET, medido por la incorporación de  $^3\text{H-NA}$ . Por lo tanto, dado que NET no estaría ejerciendo su función, se sugiere que el feto en desarrollo se encontraría expuesto a un exceso de NA.

## **9.2 Efecto del estrés crónico por frío sobre los niveles plasmáticos de Testosterona y AMH de la descendencia macho.**

Diversos estudios han mostrado que la presencia de estresores durante la preñez inducen efectos adversos en el sistema neuroendocrino de las crías, en especial si este coincide con el "periodo crítico" de diferenciación sexual del cerebro, donde existe un marcado aumento de la producción de testosterona entre los días 18 y 19 de gestación en rata. Se ha visto en ratas preñadas sometidas a estrés por restricción de movimiento desde el día 14 hasta el término de la gestación, una disminución de testosterona en el feto entre los días 18 y 19 en comparación a su control de fetos de madres no estresadas

(36), (37). Por lo que estos animales estresados *in útero*, presentaron menores concentraciones de testosterona en la adultez.

Debido a esto, se decidió cuantificar la concentración de testosterona en el plasma de las crías machos de 20 y 60 días de edad. A pesar de lo anterior, no se observan diferencias en la concentración de testosterona plasmática de la descendencia en ninguno de los grupos (20 y 60 días). Como ensayo complementario se midieron los niveles de AMH plasmática en ambos grupos. Se observó que efectivamente existe una disminución de la concentración de AMH en el grupo control de 60 días con respecto al grupo control de 20 días, lo que coincide con el efecto fisiológico de la testosterona, ya que esta hormona disminuye la concentración de AMH. Al comparar cada grupo estrés con su respectivo control no se observó diferencia significativa.

Por consiguiente, con los resultados obtenidos, podemos sugerir que el estrés crónico durante la gestación, no estaría afectando el eje HHG, algo que se ve reflejado en la concentración de testosterona de las crías.

### **9.3 Efecto del estrés crónico por frío en los niveles plasmáticos de corticosterona de la descendencia macho.**

A pesar que se ha demostrado que el estrés por frío provoca activación exclusiva del SNS, en trabajos previos de nuestro laboratorio, se ha visto un aumento en la concentración de CORT plasmática de ratas estresadas, tanto a los 15 como 19 días de gestación, lo que nos indicaría una activación del eje HHA, a diferencia de lo observado en animales no gestantes sometidos al mismo protocolo de estrés por frío (17), (15). Fisiológicamente, se ha documentado, tanto en ratas como en mujeres embarazadas, que los niveles de CORT, aumentan casi al término del embarazo ya que participa en la maduración de ciertos tejidos y órganos del feto; y que además, estimula la producción de surfactante pulmonar, siendo crítico para prepararlo hacia la vida extrauterina (38), (39).

A pesar que la CORT es un esteroide liposoluble que fácilmente cruza la barrera placentaria, existe un mecanismo que previene la prematura o inapropiada acción de esta hormona durante el desarrollo fetal. La enzima  $11\beta$ -HSD2, sintetizada en el trofoblasto, tiene como función de inactivar la CORT y transformarla a 11-dehidroxicorticosterona, la cual es incapaz de traspasar la barrera placentaria, protegiendo de este modo al feto del efecto deletéreo, de esta hormona en etapa temprana de la gestación (40). Por tanto, un aumento

de los niveles de CORT durante el embarazo puede llegar a generar efectos negativos en la descendencia.

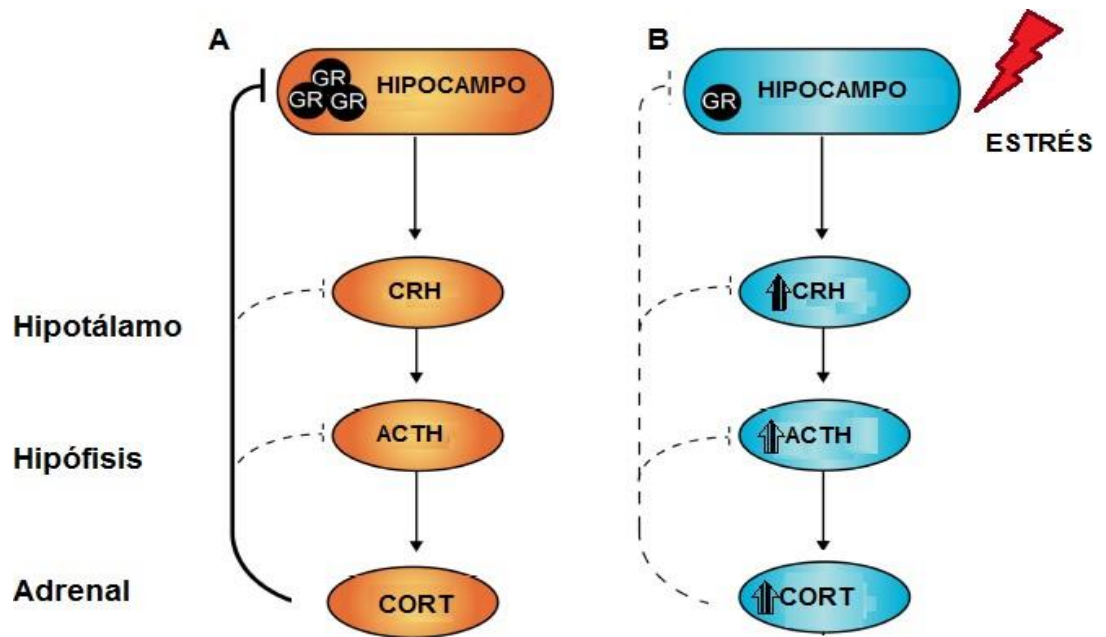
Se ha observado en ratas preñadas con restricción nutricional y dieta baja en proteínas o estrés, una reducida expresión y/o actividad de la enzima 11 $\beta$ -HSD2, exponiendo así al feto a altos niveles de CORT, provocando en la vida adulta una sobreactivación del eje HHA y estimulando el desarrollo de ciertas enfermedades tales como hipertensión arterial y diabetes tipo 2 (41). Junto con esto, estudios *in vitro* realizados utilizando una línea celular de trofoblastos han indicado que numerosos factores, tales como hipoxia, aumento de catecolaminas y citoquinas proinflamatorias durante la gestación, también disminuirían la actividad de 11 $\beta$ -HSD2 (42).

En base a todo lo expuesto anteriormente, para poder dilucidar si el estrés por frío crónico durante la gestación estaría modificando la actividad del eje HHA en las crías machos de 20 y 60 días, se procedió a medir los niveles de CORT. Observamos un incremento en la concentración de CORT plasmática en ambos grupos estresados en la vida fetal (20 y 60 días), incremento considerado significativo al ser comparado con sus respectivos controles, sugiriendo que en ambos grupos existe una hiperactividad del eje HHA. Un estudio con ratas Wistar preñadas tratadas durante toda la gestación con Carbenoxolona, un inhibidor de la enzima 11 $\beta$ -HSD2, que causa una

sobreexposición de CORT al feto, observado en las crías a los 45 días de edad elevados niveles de CORT, junto con una disminución significativa en la expresión de los receptores de glucocorticoide en el tejido hipocampal, medido a través de hibridación *in situ* (41). En este estudio se sugiere que el aumento de la concentración de CORT en las crías se debe a una disminución del *feed-back* negativo, debido a la baja expresión del receptor de glucocorticoide hipocampal, contribuyendo así al exceso de CORT en las crías.

En trabajos previos en nuestro laboratorio, se encontró que el estrés por frío durante la gestación genera un aumento en la concentración de CORT y NA plasmática en la madre (17). Como se mencionó anteriormente, se ha observado que el aumento de las catecolaminas modificaría la actividad de la enzima 11 $\beta$ -HSD2, causando una sobreexposición de CORT hacia el feto, tal como ocurre cuando hay tratamiento con Carbenoxolona (42).

Así, se sugiere que nuestro protocolo de estrés estaría generando una programación en el eje HHA, del cual se observó como indicio un aumento en la concentración de CORT de las crías estresadas in útero. En la Figura 11 se explica el mecanismo propuesto.



**Figura 11. Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal.** Bajo condiciones de estrés, la excesiva activación del eje HHA es atenuado por acción del *feedback* negativo producido por la corticosterona circulante, por acción de los receptores de glucocorticoide (GR) en el hipocampo. A.- Situación normal de regulación del eje HHA en crías control. B.- Situación estrés durante la gestación, disminuye la concentración de GR hipocampal con pérdida de la inhibición producto del *feedback* negativo (Modificado de Cottrell et al, 2009 (43)).

#### **9.4 Efecto del estrés crónico por frío sobre los niveles de receptores $\beta_1$ y $\beta_2$ -adrenérgicos cardíacos de la descendencia macho.**

Los presentes resultados muestran que el estrés gestacional por frío crónico está afectando la concentración de receptores  $\beta$ -adrenérgico en el corazón de las crías de 20 y 60 días de edad, específicamente el receptor  $\beta_1$ -adrenérgico, sin observar cambios en el receptor  $\beta_2$ -adrenérgico. Se sabe que las catecolaminas juegan un importante rol en la regulación de la función de estos receptores en el corazón, pero si el tejido es expuesto crónicamente a su ligando, ello puede provocar una selectiva desensibilización del receptor, asociado también en una disminución en la concentración de receptores  $\beta$ -adrenérgico (43). Pero por otro lado, existe otra hormona capaz de regular la concentración del receptor  $\beta$ -adrenérgico en el corazón y en otros tejidos. Los glucocorticoides también modularían a los receptores  $\beta$ -adrenérgicos. Estudios realizados en ratas hembras Sprague Dawley sometidas a adrenalectomía, muestran un rápido aumento en la cantidad de receptores  $\beta$ -adrenérgico cardíacos, cuyo aumento es revertido mediante la administración de glucocorticoides (45). Junto con esto, se ha observado que el efecto de los glucocorticoides es receptor dependiente, esto se detectó en cultivos de células troncales derivadas del tejido adiposo en período de diferenciación, que al igual que el corazón, poseen mayor cantidad de receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos que receptor  $\beta_2$ -adrenérgico. Cuando se les suplemento Dexametasona, se observó

una completa represión de los receptores  $\beta_1$ -adrenérgico y una gran inducción de  $\beta_2$ -adrenérgico (46).

Lo anterior sugiere que la disminución del receptor  $\beta_1$ -adrenérgico en las crías es inducida por el aumento de la CORT plasmática producto del estrés gestacional.

### **9.5 Razón receptores $\beta_1$ / $\beta_2$ -adrenérgicos cardíacos.**

En humano el corazón normal presenta una razón de receptores  $\beta_1$ :  $\beta_2$  adrenérgicos de 77:23, pero en patologías como insuficiencia o hipertrofia cardíaca existir un cambio notorio en su proporción a 60:38, principalmente debido a una variación en la cantidad de receptor  $\beta_1$ -adrenérgico en el corazón, sin verse modifica la población de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (47). Es debido a esto que se decidió estudiar qué estaría ocurriendo con la proporción de receptores  $\beta_1$ :  $\beta_2$  adrenérgicos en los corazones de ratas estresadas durante la gestación. .

La disminución encontrada en la razón para los animales que fueron expuestos a estrés gestacional se debe principalmente a la disminución del receptor  $\beta_1$ , corroborando así los resultados encontrados previamente.



## **9.6 Efecto del estrés crónico por frío en la concentración de Noradrenalina plasmática y cardiaca de la descendencia macho.**

Al comparar la NA plasmática de ambos grupos control (20 y 60 días) , se observó un aumento significativo de su concentración a los 60 días de edad, resultado consistente con el encontrado en la literatura, donde se demostró que los niveles de NA plasmática aumentan con el tiempo, visto en humanos y modelos animales (48). Por otro lado, no se encontró diferencia en la concentración de NA al comparar cada grupo estresado durante la vida fetal con sus respectivos controles.

Con respecto a los resultados de NA obtenidos en tejido cardíaco, encontramos una disminución significativa de su concentración en ambos grupos estrés con respecto a sus controles. Este fenómeno se podría atribuir a lo publicado por Bian et al (49), quien observo que, producto de un tratamiento con Dexametasona 0,8 mg/Kg durante el último tercio de la gestación, se produjo en las crías entre 2-42 días de edad, una deficiencia en la NA cardiaca y un menor recambio, lo que indicaría la actividad simpática cardiaca. Estos resultados indican que la exposición fetal a Dexametasona deteriora el desarrollo y actividad simpática cardiaca (49). Con relación a esto, existe evidencia que muestra el importante rol de los glucocorticoides en la diferenciación de una variedad de tipos celulares y más predominantemente, en

tejidos neuronales (50).

Muchas de las etapas críticas de replicación/diferenciación de las células neuronales se completan cuando el eje HHA alcanza total competencia (51) .En consecuencia, la administración temprana de esteroides, ya sea producto de un tratamiento con Dexametasona o producto de su elevada concentración endógena por estrés materno, provocan una inhibición en la replicación celular y promueven su diferenciación temprana, causando en el feto anomalías en el desarrollo del eje simpático cardíaco (52). De esta manera, podemos sugerir que el aumento de CORT detectado en las madres estresadas mediante el protocolo de estrés por frío crónico está programando el eje neuronal-simpático cardíaco de la descendencia macho.

## 10. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos en esta memoria de título nos permiten concluir lo siguiente:

Producto del estrés por frío durante la gestación, en la descendencia de ratas macho, no se observaron cambios en los niveles de testosterona y AMH en ninguno de los grupos analizados, lo que nos sugiere que el estrés no estaría programando al eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal. Por otro lado, sí estaría afectando el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal, ya que se observó un aumento en la concentración de CORT en la descendencia. Producto de este aumento se propone una posible regulación negativa de CORT sobre los receptores  $\beta_1$ - adrenérgico, causando la disminución observada en las crías. Junto con lo anterior, se encontró disminuida la NA cardiaca de las crías estresadas in útero, lo que nos sugiere una programación del eje neuronal-simpático cardíaco.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

1. Bustos, P., Amigo, H., Arteaga LI, A., Acosta, A. M., Rona, R. J. (2003). Factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en adultos jóvenes. *Revista Médica de Chile*, **131**(9), 973-980.
2. Nathanielsz, P. W. (2000). Fetal programming: how the quality of fetal life alters biology for a lifetime. *NeoReviews*, **1**(7), e126-e131.
3. Godfrey, K. M., & Barker, D. J. (2001). Fetal programming and adult health. *Public Health Nutrition*, **4**(2b), 611-624.
4. Barker, D. J. P. (2004). Developmental origins of adult health and disease. *Journal of Epidemiology & Community Health*, **58**(2), 114-115.
5. Drake, A. J., Walker, B. R. (2004). The intergenerational effects of fetal programming: non-genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *Journal of Endocrinology*, **180**(1), 1-16.
6. Myatt, L. (2006). Placental adaptive responses and fetal programming. *The Journal of Physiology*, **572**(1), 25-30.
7. Ramírez-Vélez, R. (2012). Programación Fetal in útero y su impacto en la salud del adulto. *Endocrinología y Nutrición*, **59**(6), 383-393.
8. Godfrey, K. M., Barker, D. J. (2000). Fetal nutrition and adult disease. *The American Journal of Clinical Nutrition*, **71**(5), 1344s-1352s.
9. Duval, F., González, F., Rabia, H. (2010). Neurobiología del estrés. *Revista Chilena de Neuro-psiquiatría*, **48**(4), 307-318.
10. Goldstein, D. S., Kopin, I. J. (2008). Adrenomedullary, adrenocortical, and sympathoneural responses to stressors: a meta-analysis. *Endocrine Regulations*, **42**(4), 111.
11. Levitt, N. S., Lindsay, R. S., Holmes, M. C., Seckl, J. R. (1996). Dexamethasone in the last week of pregnancy attenuates hippocampal

- glucocorticoid receptor gene expression and elevates blood pressure in the adult offspring in the rat. *Neuroendocrinology*, **64**(6), 412-418.
12. Macías, A. B. (2007). El campo de estudio del estrés: del Programa de Investigación Estímulo-Respuesta al Programa de Investigación Persona-Entorno. *Revista Internacional de Psicología*, **8**(02).
  13. Baserga, M., Hale, M. A., McKnight, R. A., Yu, X., Callaway, C. W., Lane, R. H. (2005). Uteroplacental insufficiency alters hepatic expression, phosphorylation, and activity of the glucocorticoid receptor in fetal IUGR rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, **289**(5), R1348-R1353.
  14. Matthews, S. G., Owen, D., Kalabis, G., Banjanin, S., Setiawan, E. B., Dunn, E. A., Andrews, M. H. (2004). Fetal Glucocorticoid Exposure and Hypothalamo-Pituitary-Adrenal (HPA) Function After Birth. *Endocrine Research*, **30**(4), 827-836.
  15. Benedict, C. R., Fillenz, M., Stanford, C. (1979). Noradrenalina release in rats during prolonged cold-stress and repeated swim-stress. *British journal of Pharmacology*, **66**(4), 521-524.
  16. Guo, A., Nappi, R. E., Criscuolo, M., Ficarra, G., Amram, A., Trentini, G. P., Genazzani, A. R. (1993). Effect of chronic intermittent stress on rat pregnancy and postnatal development. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, **51**(1), 41-45.
  17. Piquer, B. (2016) *Efecto del estrés gestacional sobre los cambios en los receptores  $\beta$ -adrenérgicos cardíacos durante el desarrollo de ratas hembras y sus consecuencias a nivel cardiovascular y metabólico*. Memoria de título de postgrado para la obtención del título de Doctor en Farmacología.
  18. Saito, K., Kurihara, M., Cruciani, R., Potter, W. Z., Saavedra, J. M. (1988). Characterization of beta 1-and beta 2-adrenoceptor subtypes in the rat

- atrioventricular node by quantitative autoradiography. *Circulation Research*, **62**(1), 173-177.
19. Morisco, C., Zebrowski, D. C., Vatner, D. E., Vatner, S. F., Sadoshima, J. (2001).  $\beta$ -Adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the  $\beta_1$ -subtype in the rat heart. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, **33**(3), 561-573.
  20. Bahamondes, G. (2011) Estrés crónico intermitente aplicado en ratas durante el periodo de gestación induce “programming” sobre el tejido cardíaco en la descendencia de ratas machos. Memoria de título d para obtener el título de Químico farmacéutico.
  21. Ozaki, T., Nishina, H., Hanson, M. A., Poston, L. (2001). Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *The Journal of Physiology*, **530**(1), 141-152.
  22. Mueller, B. R., Bale, T. L. (2008). Sex-specific programming of offspring emotionality after stress early in pregnancy. *Journal of Neuroscience*, **28**(36), 9055-9065.
  23. O'Shaughnessy, P. J., Fowler, P. A. (2011). Endocrinology of the mammalian fetal testis. *Reproduction*, **141**(1), 37-46.
  24. Seale, J. V., Wood, S. A., Atkinson, H. C., Lightman, S. L., Harbuz, M. S. (2005). Organizational role for testosterone and estrogen on adult hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the male rat. *Endocrinology*, **146**(4), 1973-1982.
  25. Pallarés, M. E., Adrover, E., Baier, C. J., Bourguignon, N. S., Monteleone, M. C., Brocco, M. A., Antonelli, M. C. (2013). Prenatal maternal restraint stress exposure alters the reproductive hormone profile and testis development of the rat male offspring. *Stress*, **16**(4), 429-440.

26. Rosano, G. M. C., Sheiban, I., Massaro, R., Pagnotta, P., Marazzi, G., Vitale, C., Fini, M. (2007). Low testosterone levels are associated with coronary artery disease in male patients with angina. *International Journal of Impotence Research*, **19**(2), 176-182.
27. Kruger, N. J. (1994). The Bradford method for protein quantitation. *Basic Protein and Peptide Protocols*, **9**-15.
28. Rouiller-Fabre, V., Carmona, S., Merhi, R. A., Cate, R., Habert, R., Vigier, B. (1998). Effect of anti-Müllerian hormone on Sertoli and Leydig cell functions in fetal and immature rats. *Endocrinology*, **139**(3), 1213-1220.
29. Davies, A. O., Lean, A. D., Lefkowitz, R. J. (1981). Myocardial beta-adrenergic receptors from adrenalectomized rats: impaired formation of high-affinity agonist-receptor complexes. *Endocrinology*, **(2)**, 720-722.
30. Roa, I., Smok, C., Prieto, R. (2012). Placenta: anatomía e histología comparada. *International Journal of Morphology*, **30**(4), 1490-1496.
31. Lewis, R. M., Poore, K. R., Godfrey, K. M. (2006). The role of the placenta in the developmental origins of health and disease implications for practice. *Reviews in Gynaecological and Perinatal Practice*, **6**(1), 70-79.
32. Myatt, L. (2006). Placental adaptive responses and fetal programming. *The Journal of Physiology*, **572**(1), 25-30.
33. Hemmings, D. G., Williams, S. J., & Davidge, S. T. (2005). Increased myogenic tone in 7-month-old adult male but not female offspring from rat dams exposed to hypoxia during pregnancy. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, **289**(2), H674-H682.
34. Grigore, D., Ojeda, N. B., & Alexander, B. T. (2008). Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gender Medicine*, **5**, S121-S132.
35. Bottalico, B., Larsson, I., Brodzki, J., Hernandez-Andrade, E., Casslén, B., Marsal, K., Hansson, S. R. (2004). 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*, **25**(6), 518-529.
36. Ward, I. L., Weisz, J. (1980). Maternal stress alters plasma testosterone in fetal males. *Science*, **207**(4428), 328-329
37. Anderson, R. H., Fleming, D. E., Rhees, R. W., Kinghorn, E. (1986). Relationships between sexual activity, plasma testosterone, and the volume of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in prenatally stressed and non-stressed rats. *Brain Research*, **370**(1), 1-10.
38. Dupouy, J. P., Coffigny, H., Magre, S. (1975). Maternal and foetal corticosterone levels during late pregnancy in rats. *Journal of Endocrinology*, **65**(3), 347-352.
39. Cohen, A. (1973). Plasma corticosterone concentration in the foetal rat. *Hormone and metabolic research Hormon-und Stoffwechselforschung= Hormones et Metabolisme*, **5**(1), 66-66.
40. Seckl, J. R. (1997). Glucocorticoids, feto-placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2, and the early life origins of adult disease. *Steroids*, **62**(1), 89-94.
41. Welberg, L. A., Seckl, J. R., Holmes, M. C. (2000). Inhibition of 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR mRNA expression and anxiety-like behaviour in the offspring. *European Journal of Neuroscience*, **12**(3), 1047-1054.
42. Hardy, D. B., Dixon, S. J., Narayanan, N., Yang, K. (2001). Calcium inhibits human placental 11 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **283**(4), 756-761.



43. Sporn, J. R., Harden, T. K., Wolfe, B. B., & Molinoff, P. B. (1976). Beta-Adrenergic receptor involvement in 6-hydroxydopamine-induced supersensitivity in rat cerebral cortex. *Science*, **194**(4265), 624-626.
44. Saito, K., Kurihara, M., Cruciani, R., Potter, W. Z., Saavedra, J. M. (1988). Characterization of beta 1-and beta 2-adrenoceptor subtypes in the rat atrioventricular node by quantitative autoradiography. *Circulation Research*, **62**(1), 173-177.
45. Abrass, I. B., Scarpace, P. J. (1981). Glucocorticoid regulation of myocardial  $\beta$ -adrenergic receptors. *Endocrinology*, **108**(3), 977-980.
46. Feve, B., Emorine, L. J., Briend-Sutren, M. M., Lasnier, F., Strosberg, A. D., Pairault, J. (1990). Differential regulation of beta 1-and beta 2-adrenergic receptor protein and mRNA levels by glucocorticoids during 3T3-F442A adipose differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, **265**(27), 16343-16349.
47. Bristow, M. R., Ginsburg, R; Umans, V., Fowler, M., Minobe, W., Rasmussen, R, J. S. (1986). 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. *Circulation research*, **59**(3), 297-309.
48. Ziegler, M. G., Lake, C. R., Kopin, I. J. (1976). Plasma noradrenaline increases with age. *Nature*, **261**(5558), 333.
49. Bian, X., Seidler, F. J., & Slotkin, T. A. (1993). Fetal dexamethasone exposure interferes with establishment of cardiac noradrenergic innervation and sympathetic activity. *Teratology*, **47**(2), 109-117.
50. Meyer, J. S. (1985). Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiological Reviews*, **65**(4), 946-1020.

51. Miyaboh, S., Yanagisawa, K. I., Ooya, E., Hisada, T., Kishida, S. (1980). Ontogeny of circadian corticosterone rhythm in female rats: Effects of periodic maternal deprivation and food restriction. *Endocrinology*, **106**(2), 636-642.
52. Ciaranello, R. D., Jacobowitz, D., & Axelrod, J. (1973). Effect of Dexamethasone on phenylethanolamine N-methylethanolamine N-methyltransferase in chromaffin tissue of the neonatal rat. *Journal of Neurochemistry*, **20**(3), 799-805.