



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE QUÍMICA Y FARMACIA

Efectos del estrés crónico en ratas gestantes y las implicancias en la función reproductiva de su descendencia en la edad puberal y en la adultez

Favián Andrés Uribe Vargas

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

Director de Tesis: **Dr. Gonzalo Cruz Neculpán**

Codirector de Tesis: **Dr. Hernán Lara Peñaloza**

2015

Índice

Resumen	2
Abstract.....	3
Introducción.....	4
El Estrés Crónico.....	4
Control endocrino y neural de la foliculogénesis ovárica.....	5
Estrés simpático durante la gestación y alteraciones reproductivas de la descendencia.....	6
Hipótesis	8
Objetivos.....	9
Objetivo General:	9
Objetivos Específicos:	9
Materiales y Métodos.....	10
Animales de experimentación	10
Diseño experimental	10
Morfometría	11
Análisis Estadístico	11
Resultados	12
1. Efecto de la exposición EFCl durante la gestación sobre el desarrollo folicular ovárico de las hijas a los 39 días de edad.....	12
2. Efecto de la exposición EFCl durante la gestación sobre el desarrollo folicular ovárico de las hijas a los 60 días de edad.....	15
Discusión	18
1. Desarrollo folicular ovárico en ratas de 39 días de edad hijas de ratas sometidas a EFCl durante la preñez	19
2. Desarrollo folicular ovárico en ratas de 60 días de edad hijas de ratas sometidas a EFCl durante la preñez.....	22
3. Relevancia del modelo experimental y mecanismos propuestos.....	23
Conclusión.....	25
Referencias	26

Resumen

La exposición a diversos agentes estresores produce una activación simpática que pueden afectar directamente la función reproductiva del individuo a través de la liberación de noradrenalina. La exposición a estrés por frío crónico en ratas gestantes produce que la descendencia presente un menor desarrollo folicular y una disminución de la sensibilidad a la hormona FSH en la etapa neonatal y prepuberal. Nuestra hipótesis plantea que estas alteraciones se mantienen hasta la etapa puberal y hasta la adultez en ratas hijas de madres estresadas. Ratas de la cepa Sprague-Dawley se sometieron a estrés por frío crónico intermitente (EFCI) (4°C por 3 horas /día) durante todo el periodo gestacional. La descendencia de estas ratas en la edad puberal presentó un menor desarrollo folicular preantral con acumulación de folículos primordiales y primarios. Además, se observó un menor recuento de folículos secundarios, acumulación de folículos antrales sanos en los estadios más pequeños y un aumento de los folículos atrésicos. Por otra parte, estas ratas púberes tuvieron un menor recuento de cuerpos lúteos lo que indica un menor número de ovulaciones. En la etapa adulta no se observó ninguno de estos cambios, ya que las ratas hijas de madres estresadas tenían el mismo perfil de desarrollo folicular que hijas de madres controles. Esto nos sugiere que las alteraciones en el desarrollo folicular producidas por el frío crónico intermitente se mantienen hasta la etapa puberal pero son normalizadas en la etapa adulta cuando el control hipotalámico está maduro.

Abstract

Exposure to several stressors produces a sympathetic activation that may directly affect the reproductive function of the body through the release of norepinephrine. The chronic exposure to cold stress in pregnant rats produces an altered follicular development and decreased sensitivity to FSH in neonatal and prepubertal offspring. Our hypothesis is that these alterations remain until pubertal stage and into adulthood in offspring of stressed mothers. Sprague-Dawley rats were submitted to chronic intermittent cold stress (EFCI) (4°C for 3 hours / day) throughout the gestational period. The offspring of these rats showed a smaller preantral follicular development with accumulation of primordial and primary follicles at pubertal age. Furthermore, these rats had a less number of secondary follicles, an accumulation of healthy antral follicles and an increase in atretic antral follicles. Moreover, offspring of stressed rats had a lower number of corpora lutea indicating a lower ovulation rate. None of these changes was observed in the adult stage, since offspring of stressed mothers showed the same profile of ovarian follicular development than control rats. This suggests that the alterations in follicular development caused by chronic intermittent cold stress remain until pubertal stage but follicular development returns to be normal in the adulthood. Possibly the maturation of hypothalamic control of reproductive axis participates in this normalization.

Introducción

El Estrés Crónico

Los seres humanos, así como otras especies, se enfrentan diariamente a diversas situaciones de estrés en que el organismo se manifiesta con una respuesta inespecífica afectando células, tejidos y/u órganos[1] ajustando así su función [2] y conducta (psicológica y social) [3, 4] como un mecanismo adaptativo [5] para mantener la homeostasis. Por otra parte, cuando la condición se torna imposible de superar a corto plazo [6] y se prolonga en el tiempo, se produce el estrés crónico, el cual cambia las reglas de autorregulación, requiriéndose nuevas estrategias de adaptación que tienen un costo para el organismo y que pueden afectar la función de distintos órganos alterando la morbilidad y mortalidad [4]). De hecho, se ha demostrado que el estrés crónico puede alterar procesos tan importantes como la reproducción, alcanzando incluso a la descendencia de los individuos sometidos a estrés [3]

El alcance a nivel fisiológico, psicológico y social antes mencionado y las manifestaciones tanto bioquímicas como clínicas de la respuesta al estrés dependen del tipo de estrés que sufre el organismo. Dentro de los diversos tipos de estrés, el estrés por frío crónico intermitente (EFCI) en roedores provoca un aumento selectivo de la actividad del sistema nervioso simpático, con un aumento específico de Noradrenalina (NA) a nivel plasmático y un aumento de la actividad de fibras nerviosas que inervan diversos órganos[7]. Particularmente, el EFCI no altera los niveles de otras hormonas como Adrenalina o ACTH [8, 9]permitiendo que sea un buen modelo de una hiperactivación noradrenérgica selectiva. Es de nuestro particular interés estudiar el efecto del estrés sobre la regulación nerviosa que posee el ovario ya que se ha demostrado su importancia en el control de la foliculogénesis [10-12]

Control endocrino y neural de la foliculogénesis ovárica

Los ovarios corresponden a la gónada femenina y sus funciones principales son tanto la síntesis de hormonas esteroidales y peptídicas como también proporcionar un ambiente adecuado para el desarrollo, diferenciación y liberación del ovocito maduro (Gametogénesis) [13]. Estas funciones están reguladas intrínsecamente por señales neuroendocrinas del eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario (HHO). El Hipotálamo libera el factor liberador de gonadotrofinas (GnRH) que a través de un sistema porta alcanza la Hipófisis anterior (adenohipófisis) estimulando la síntesis y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) producidas por el gonadotrofo. La FSH regula principalmente la foliculogénesis y la secreción de estradiol a través de la activación de la enzima CYP19 aromatasas y la LH es esencial para el proceso de ovulación [14]. Este complejo eje es regulado por mecanismos de retroalimentación (o feedback) positivo y negativo, entre otras funciones, lo cual permite aumentar o disminuir la actividad pulsátil desde el Hipotálamo y también regular la secreción de gonadotrofinas desde la hipófisis [15, 16]. Además de la regulación neuroendocrina realizada por el eje HHO, existe otro mecanismo regulatorio de tipo neural a partir de fibras nerviosas simpáticas postganglionares que conforman el plexo ovárico (PO) [17, 18] y el nervio ovárico superior (SON) alcanzando una distribución perivascular y en el estroma ovárico respectivamente, en donde el SON participa en la síntesis de esteroides dado que está asociado a células de la teca a nivel de los folículos ováricos [19]. El uso de marcadores virales por parte de Gerendai y col. [20] para el trazado retrogrado de las vías neuronales permitieron a su vez identificar los somas neuronales de las vías nerviosas que inervan el ovario, estableciendo que la vía nerviosa parte desde el Sistema Nervioso Central (Núcleo paraventricular del hipotálamo) proyectándose el tronco encéfalo y haciendo su último relevo en el ganglio celiaco. La inervación simpática en el ovario es noradrenérgica y la evidencia sugiere que la actividad simpática sobre la función ovárica facilita el efecto de las gonadotrofinas en el desarrollo folicular y la esteroidogénesis ovárica [11, 21, 22]

Varios trabajos han demostrado la importancia de la regulación nerviosa sobre la función ovárica, por ejemplo, Lara y col. [22] demostraron que ratas neonatas sometidas a denervación mediante la

administración de anticuerpos anti factor de crecimiento nervioso (NGF Ab) presentan un retraso en el desarrollo del ovario con el consecuente retraso de la pubertad, retraso en el desarrollo folicular y alteración del ciclo estral. En otra aproximación experimental, el uso de Guanetidina en edad neonatal provoca la pérdida selectiva de la inervación simpática por un mecanismo inmunológico, sin alterar el circuito neuronal sensorial ni colinérgico con similares consecuencias en la apertura vaginal (retraso de la pubertad), primera ovulación retardada e interrupción del ciclo estral [22]. Por otra parte, la resección del nervio superior ovárico (Fuente de la mayor parte de la inervación noradrenérgica ovárica) resulta en una caída inmediata de la producción de esteroides sugiriendo que la fase periovulatoria posee un componente hormonal y estimulador neuronal [23]. Con respecto a efectos directos de la estimulación adrenérgica sobre la foliculogénesis, Mayerhofer y col. establecen que la acción beta-adrenérgica sobre los folículos incrementa la producción de AMPc e induce la expresión del receptor de FSH en folículos pequeños de ratas neonatas.

Además de las alteraciones producidas por una hipofunción adrenérgica en el ovario, la exposición a ratas adultas a EFCI genera un aumento de la actividad simpática con aumento de los niveles de NA en ovario, que se ha relacionado con alteraciones en el desarrollo folicular, folículos con hipertecosis y además formación de quistes ováricos[24, 25]

Estrés simpático durante la gestación y alteraciones reproductivas de la descendencia

La *hipótesis de Barker* establece que la exposición a estrés, disruptores endocrinos o alteraciones en la nutrición en periodos susceptibles durante el desarrollo, como el periodo gestacional, produce efectos a largo plazo en la descendencia. Las alteraciones pueden manifestarse al momento de nacer (como por ejemplo bajo peso al nacer), como también en la vida adulta, entre ellas enfermedades degenerativas y enfermedades crónicas no transmisibles [26-28]. Estos cambios obedecen según lo establecido por Barker a una programación (o "programming") que se entiende como una alteración fisiológica de un tejido u órgano producida por la exposición a estímulo deletéreo durante un periodo crítico del desarrollo fetal [5]. Dentro de estos estímulos deletéreos se

encuentra el estrés durante la gestación en sus diversas formas como psicosocial (angustia) o físico (frío, sobrecarga física, resistencia) [29], los cuales alteran el desarrollo del feto, el nacimiento y el desarrollo postnatal [3, 30].

La exposición de ratas adultas a EFCI [24, 25] produce diversas alteraciones en la función reproductiva (detalladas anteriormente) que se explican por una sobreactivación de las fibras nerviosas ováricas. Sin embargo, si se someten madres gestantes a EFCI, se produce un cambio adaptativo en la descendencia con una disminución de la expresión de NGF en el ovario durante el periodo neonatal que lleva posteriormente a una disminución de la noradrenalina ovárica en el periodo prepuberal [31]. Esta condición hipoadrenérgica observada se relaciona con un menor desarrollo folicular debido a una baja sensibilidad a gonadotropina FSH [31]. Esta baja respuesta a FSH se relaciona con una disminución de la NA ovárica y NGF ovárico, ya que los 2 mediadores inducen la expresión del FSHR en las células de granulosa ovárica [11, 32]. El retraso en el desarrollo folicular producido hasta el periodo prepuberal es coherente con una pubertad tardía y además con la menor cantidad de folículos preovulatorios que se observan en estos animales [31]. Nuestro estudio pretende determinar si las alteraciones observadas en el desarrollo folicular, en sus distintos estadios proliferativos, permanecen después de la pubertad y/o adultez.

Hipótesis

El estrés por frío crónico intermitente durante la gestación programa alteraciones en el desarrollo folicular ovárico de la descendencia que permanecen hasta la etapa puberal y adultez de la rata

Objetivos

Objetivo General:

Determinar los efectos producidos por el estrés por frío crónico intermitente durante la gestación en rata sobre el desarrollo folicular ovárico de la descendencia a los 39 y 60 días de edad.

Objetivos Específicos:

1. Determinar la cantidad de folículos primordiales, preantrales, antrales sanos, antrales atrésicos y cuerpos lúteos en el ovario de ratas de 39 días de edad (etapa puberal) descendientes de madres sometidas a estrés por frío crónico intermitente durante la gestación.
2. Determinar la cantidad de folículos primordiales, preantrales, antrales sanos, antrales atrésicos y cuerpos lúteos en el ovario de ratas de 60 días de edad (etapa adulta) descendientes de madres sometidas a estrés por frío crónico intermitente durante la gestación.

Materiales y Métodos

Animales de experimentación

En esta tesis se utilizaron muestras de animales que ya han sido recolectadas y que pertenecen al proyecto FONDECYT 1130049, cuyo investigador principal es el Dr. Hernán Lara Peñaloza de la facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile.

Se utilizó ratas hembras vírgenes de la cepa Sprague-Dawley, con un peso de entre 250 y 300g aproximadamente. Estas se mantuvieron en un ciclo de luz: oscuridad 12h :12h a una temperatura promedio de $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, con acceso a alimento y agua *ad libitum*.

Tanto la mantención de los animales de experimentación como el seguimiento de las series experimentales se realizaron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile. Se realizaron todos los esfuerzos posibles para minimizar el número de animales. Las series experimentales y procedimientos han sido aprobados por el comité de bioética de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile y de la comisión nacional de investigación científica y tecnológica (CONICYT).

Diseño experimental

Las ratas hembras se colocaron con machos cuando se encontraban en la etapa de proestro [33] con el objetivo de controlar y conocer el día 1 de gestación, caracterizado por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal. Las hembras preñadas se separaron en un Grupo Control (GC) y un Grupo Estrés (GE). Las ratas del GE fueron sometidas a EFCl a 4°C por 3h diariamente durante todo el período de gestación. Las ratas del GC serán sometidas al mismo procedimiento, con la diferencia de que serán expuestas a temperatura ambiente. Una vez nacidas las crías fueron eutanasiadas a los 39 días de edad (etapa puberal) y 60 días de edad (etapa adultez) (Fig.Nº1) y se extrajeron los siguientes tejidos: ovarios (derecho e izquierdo), ganglio celiaco, suero, hipotálamo ventromedial, corazón y cuernos uterinos. En esta tesis, se utilizarán los ovarios derechos para realizar morfometría de los folículos en los grupos de ratas de 39 y 60 días de edad, ya que los grupos de 4 y 30 días fueron evaluados por el Dr. Rafael Barra en su tesis doctoral [34]

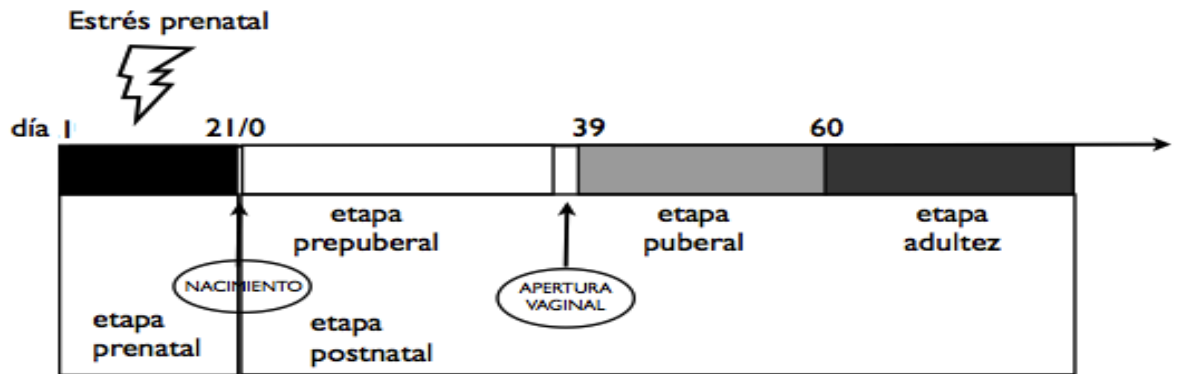


Fig. N°1 Diseño experimental. El protocolo de estrés aplicado consistirá en someter a las ratas gestantes por todo el período de gestación a 4°C por 3h diariamente (color negro). Las muestras serán recolectadas a los 39 y 60 días de edad para las ratas descendientes.

Morfometría

1) Procedimiento histológico: se realizó la extracción del ovario derecho e inmediatamente se fijó con “Bouin alcohólico” durante 24h, posteriormente se colocó en etanol 70% por al menos 24h, para luego ser incluidos en parafina. Se realizaron cortes seriados y consecutivos con un espesor de 6µm a los que se les aplicó una tinción de Hematoxilina-Eosina.

2) Recuento morfológico: Se utilizaron criterios para el recuento de estructuras foliculares publicados anteriormente [35] y se analizaron las poblaciones de folículos primordiales, primarios, secundarios, antrales sanos, antrales atrésicos, y cuerpos lúteos. Este análisis comprendió el recuento total de estructuras foliculares, su tamaño y distribución.

Análisis Estadístico

Los datos fueron analizados mediante uso de programa computacional GraphPad Prism® v.5.0 usando t de Student de una cola para comparar el número de folículos para las poblaciones entre grupo Control y grupo Estrés. Los resultados fueron expresados como el promedio ± el error estándar promedio (SEM). Se estableció *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001 para indicar las diferencias estadísticamente significativas.

Resultados

1. Efecto de la exposición EFCI durante la gestación sobre el desarrollo folicular ovárico de las hijas a los 39 días de edad

En la figura 2 se muestran los efectos de la exposición a EFCI durante la preñez sobre la cantidad y el desarrollo de los folículos preantrales en ratas hijas de 39 días de edad. La cantidad de folículos primordiales y de folículos primarios incrementa en el grupo estrés en comparación con controles (Fig. 2A y Fig. 2B, respectivamente). Debido a esto, no hay cambios en la relación entre el número de folículos primarios respecto del número de folículos primordiales (Fig. 2D). A pesar del aumento en el número de folículos primordiales y primarios, se observó un menor número de folículos secundarios en el grupo estrés con respecto al grupo control (Fig. 2C). Lo anterior disminuye la relación entre número de folículos secundarios respecto del número de folículos primarios en el grupo estrés con respecto al grupo control (Fig. 2E). En la Fig. 2F se muestra la distribución por tamaño del número folículos primarios y folículos secundarios. Se observa un aumento en el número de folículos primarios de tamaño menor a $40\mu\text{m}$ y también un aumento en el número de folículos que se encuentran en el rango entre $40\mu\text{m}$ y $49\mu\text{m}$ en el grupo estrés comparado con controles. Paralelo a este aumento del número de folículos primarios en los menores tamaños, se evidencia una disminución en el número de folículos secundarios en el rango de tamaño entre $80\mu\text{m}$ y $89\mu\text{m}$, y también superiores a $89\mu\text{m}$.

En la Figura 3 se muestran los efectos de la exposición a EFCI durante la preñez sobre la cantidad y el desarrollo de los folículos antrales y cuerpos lúteos en ratas hijas de 39 días de edad. La cantidad total de folículos antrales sanos aumenta en el grupo estrés (Fig. 3A) y se observa una mayor agrupación de los folículos dentro del rango de tamaño inferior a $200\mu\text{m}$ en comparación al grupo control (Fig. 3B). Así también, se evidencia un mayor número de folículos antrales atrésicos en el grupo estrés respecto al grupo control (Fig. 3C) en donde los folículos antrales atrésicos se encuentran concentrados en los rangos $<200\mu\text{m}$ y en el rango entre $200\mu\text{m}$ y $399\mu\text{m}$ (Fig. 3D). El

recuento de cuerpos lúteos muestra una fuerte disminución en el número de cuerpos lúteos en el grupo estrés respecto al grupo control (Fig. 3E).

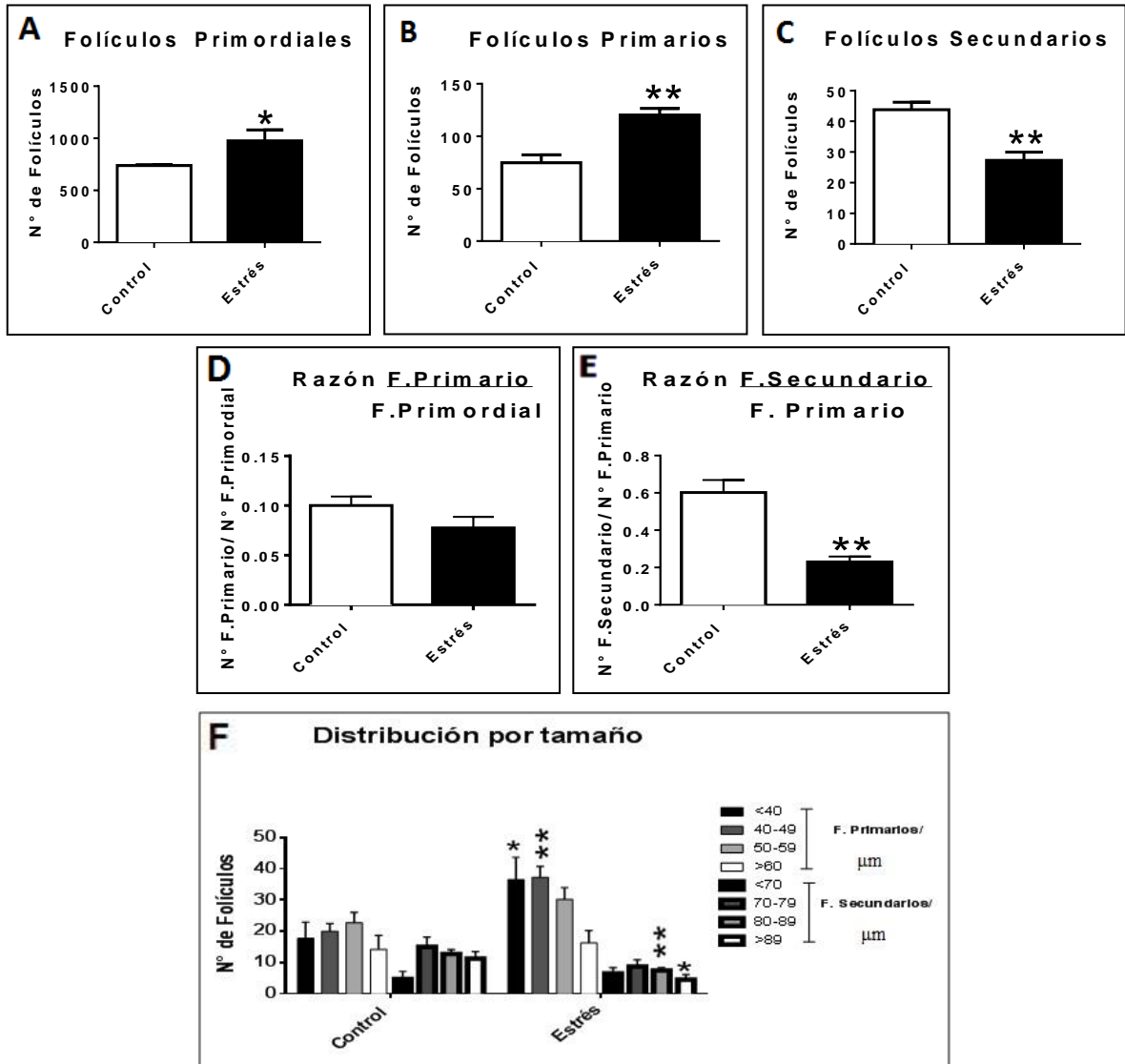


Figura N°2. Folículos Preantrales en grupo estrés versus control a los 39 días de edad. A) Folículos primordiales totales. B) Relación F.Primarios/F.Primordiales. C) Folículos primarios totales. D) Relación F.Secundarios/F.Primarios. E) Folículos secundarios totales. F) Distribución por tamaño: Folículos Primarios y Folículos Secundarios. Todos los gráficos corresponden al promedio \pm error estándar. Las diferencias significativas se establecieron con un * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t de Student).

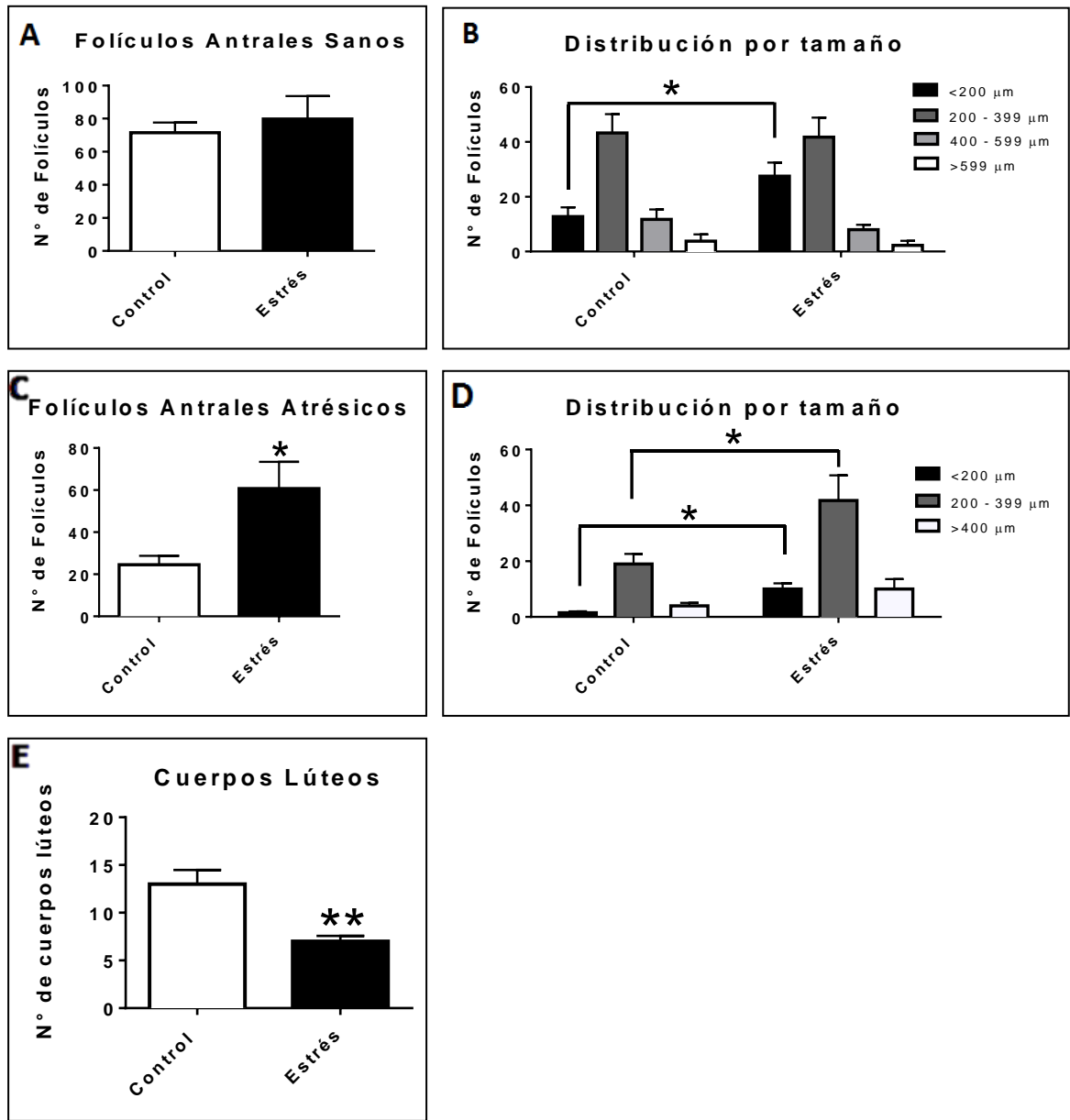


Fig.Nº3. Folículos antrales y Cuerpos lúteos (39 días): A) Folículos antrales sanos totales; B) Distribución por tamaño Folículos Antrales Sanos; C) Folículos Antrales Atrésicos; D) Distribución por tamaño Folículos Antrales Atrésicos; E) Cuerpos Lúteos totales. Todos los gráficos corresponden al promedio \pm error estándar. El N corresponde al número de animales utilizados en cada grupo, las diferencias significativas se establecieron con un * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ (t de Student).

2. Efecto de la exposición EFCI durante la gestación sobre el desarrollo folicular ovárico de las hijas a los 60 días de edad

En la figura 4 se muestran los efectos de la exposición a EFCI durante la preñez sobre la cantidad y el desarrollo de los folículos preantrales en ratas hijas de 60 días de edad. El análisis morfométrico, de folículos primordiales totales así como en el número total de folículos primarios, permite evidenciar que no existen mayores diferencias entre el grupo control y el grupo estrés (Fig. 4A y Fig. 4B). Así mismo, la relación entre folículos primarios y folículos primordiales no presenta diferencias significativas entre el grupo control y el grupo estrés (Fig. 4D). En la figura 4C no se aprecian cambios respecto al número total de folículos secundarios entre el grupo control y el grupo estrés. La relación entre folículos secundarios y folículos primarios no presenta cambios en el grupo estrés respecto al grupo control (Fig. 4E). Al analizar la distribución por tamaño se observa que no hay cambios evidentes entre los grupos control y grupo estrés tanto para las poblaciones de folículos primarios como para las poblaciones de folículos secundarios (Fig. 4F).

En la Figura 5 se muestran los efectos del EFCI durante la preñez sobre la cantidad y el desarrollo de los folículos antrales y cuerpos lúteos en ratas hijas de 60 días de edad. El recuento de folículos antrales sanos totales no muestra cambios significativos entre el grupo control y el grupo estrés (Fig. 5A) y la distribución por tamaño, de los folículos antrales sanos, es similar para ambos grupos (Fig. 5B). El análisis del recuento de folículos antrales atrésicos no evidencia cambios en el número total para las poblaciones del grupo control y el grupo estrés (Fig. 5C). Así mismo la distribución por tamaño, de folículos antrales atrésicos, muestra un número similar para todos los rangos definidos (Fig. 5D). Luego de cuantificar el número de cuerpos lúteos, para el grupo control y el grupo estrés, se observa que no existen cambios significativos entre ambos grupos (Fig 5E).

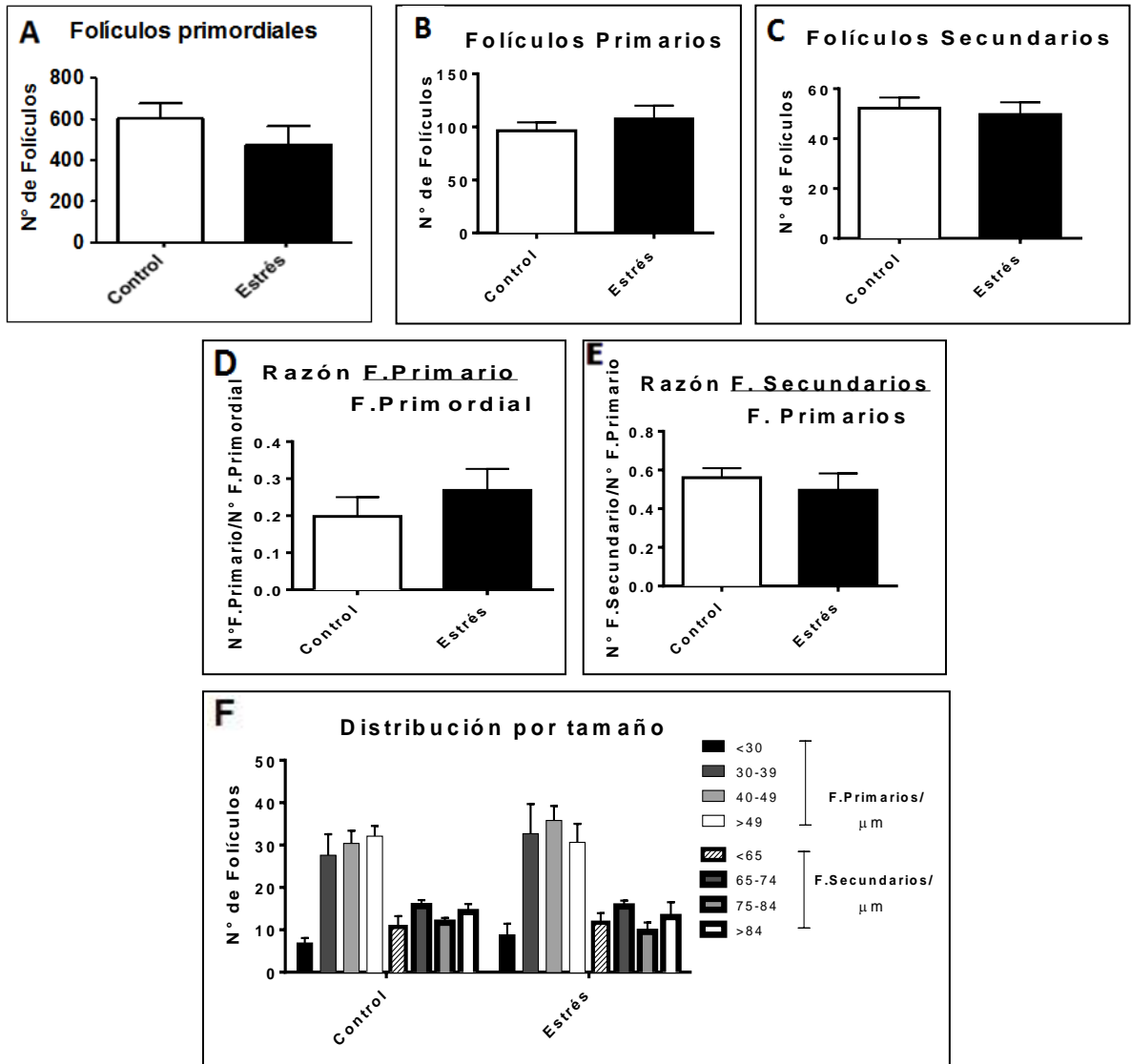


Fig.Nº4. Folículos Preantrales (60 días): A) Folículos primordiales totales. B) Relación F.Primarios/F.Primordiales. C) Folículos primarios totales. D) Relación F.Secundarios/F.Primarios. E) Folículos secundarios totales. F) Distribución por tamaño. Todos los gráficos corresponden al promedio \pm error estándar.

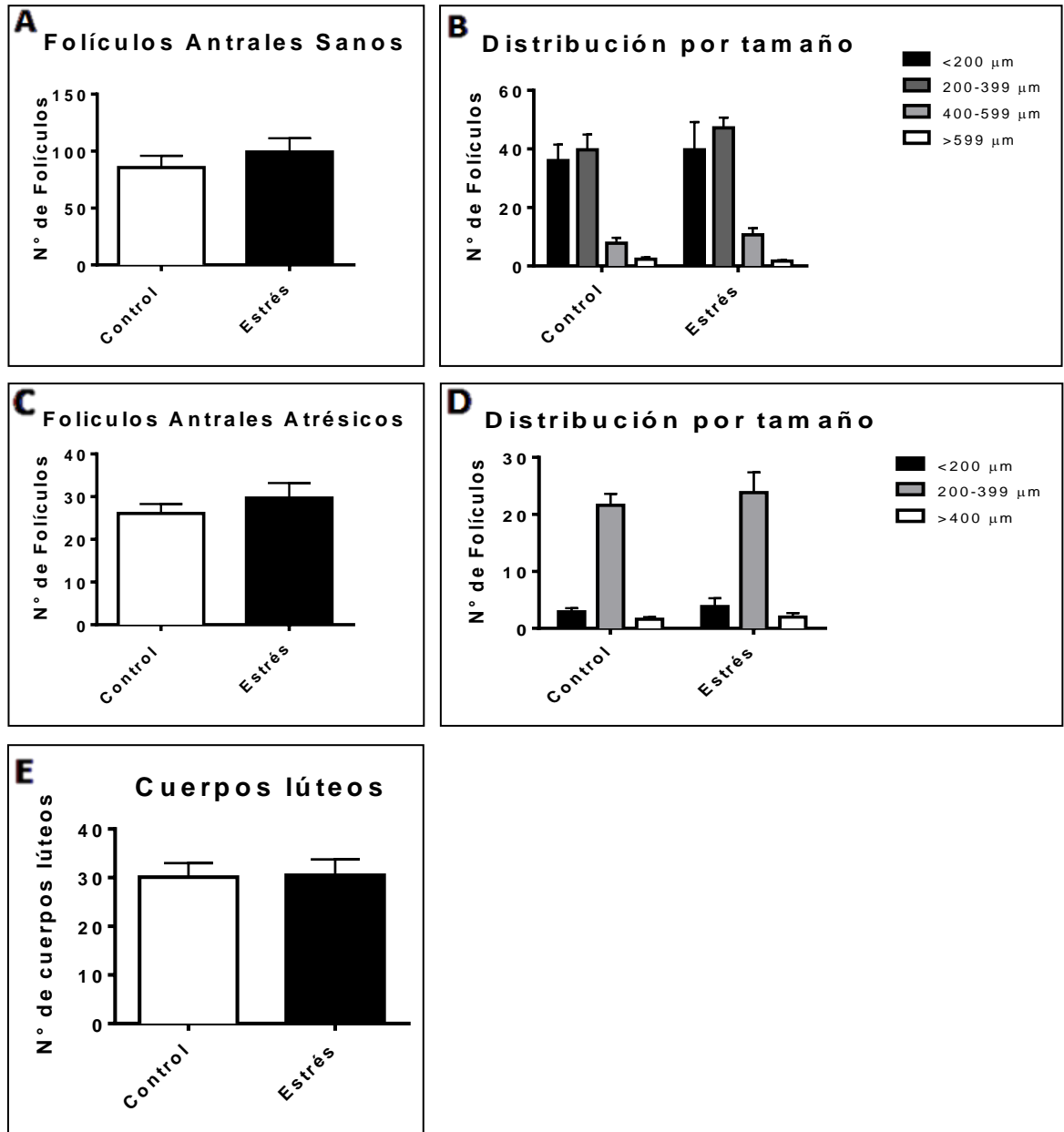


Fig.Nº5. Folículos antrales y Cuerpos lúteos (60 días): A) Folículos antrales sanos totales; B) Distribución por tamaño Folículos Antrales Sanos; C) Folículos Antrales Atrésicos; D) Distribución por tamaño Folículos Antrales Atrésicos; E) Cuerpos Lúteos totales. Todos los gráficos corresponden al promedio \pm error estándar.

Discusión

Varios autores han investigado y reconocido que la exposición a estrés crónico durante la gestación tiene un impacto en el desarrollo de la descendencia. Recientemente, Barra y col., 2014 demostraron que la exposición a EFCI durante la preñez disminuye la reserva folicular y el reclutamiento de los folículos, lo que conduce a una pubertad tardía y alteraciones de la ciclicidad estral. La elaboración del presente trabajo nos permitió caracterizar el impacto de la exposición a EFCI durante la preñez sobre la función reproductiva de la descendencia en las etapas puberal y adulta. Nuestros resultados muestran que después de la pubertad existen aún alteraciones en el desarrollo folicular, sin embargo, se reestablece una situación normal en cuanto a las poblaciones de folículos ováricos en la adultez, no perpetuándose los cambios hasta esta etapa. Para un mejor entendimiento se muestra un resumen de los resultados en la figura 6.

Folículos	Primordiales	Primarios	Secundarios	A.Sanos	A.Atrésico	C. Lúteos
PND4	↓ ***	↓ **	↓ *	--	--	--
PND30	↓ *	↓ *	↓ ns	↓ ns		--
PND39	↑ *	↑ **	↓ **	N	↑ *	↓ **
PND60	N	N	N	N	N	N

Figura N°6: Resumen de los resultados obtenidos por Barra y col., 2014 y los obtenidos en esta tesis. PND: Día postnatal, N: valores similares entre grupo Estrés y grupo Control. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001; ns: no significativo (sólo indica tendencia).

1. Desarrollo folicular ovárico en ratas de 39 días de edad hijas de ratas sometidas a EFCI durante la preñez

Los análisis de las poblaciones foliculares a los 4 y 30 días de edad realizados por Barra y col., 2014, evidenciaron un menor número de folículos primordiales para el grupo Estrés, debido a un aumento de la apoptosis causado probablemente por una alteración del ensamblaje folicular. También demostraron que las ratas hembras descendientes de madres sometidas a EFCI presentan niveles disminuidos de NA y su metabolito MHPG respectivamente, esto probablemente debido a una menor inervación simpática ovárica. La menor inervación simpática se establece debido a una menor acción neurotrófica mediada por NGF, encontrada en el ovario de ratas de 4 días de vida, ya que el ovario es capaz de sintetizar este factor [23], el que participa en el establecimiento de las fibras nerviosas en el ovario [24]. Tanto la actividad adrenérgica como neurotrófica modulan la acción de neurotransmisores y se relacionan con estimulación de la esteroidogénesis y el desarrollo folicular [36].

En este trabajo observamos que a los 39 días de edad la descendencia de madres sometidas a EFCI presenta un aumento del número de folículos primordiales y primarios, además de una disminución en el número de folículos secundarios. Esto se puede deber a que existe un menor reclutamiento de los folículos desde sus estadios más tempranos como describieron Barra y cols., 2014 para ratas de 4 y 30 días de edad. Para analizar el progreso de los folículos desde una etapa específica a la siguiente, se pueden realizar razones entre el número de folículos de dicha etapa y el número de folículos de la etapa precedente, asumiendo que el desarrollo folicular es continuo. La razón Primarios/Primordiales a los 39 días se encontraba normal en el grupo Estrés comparado con el grupo Control, lo que indica que la cantidad de folículos que han avanzado a la etapa de folículo primario es proporcional al número de folículos primordiales. Sin embargo, la razón Secundario/Primario se encuentra fuertemente disminuida. Esto indica que la transición de folículo primario a secundario ocurre más lentamente. De esta forma, es lógico que se acumulen los folículos primarios, y en consecuencia exista una acumulación de folículos primordiales. Dentro de los factores que se encuentran alterados en este modelo, se encuentra que ratas de 4 y 30 días de

edad tienen una menor sensibilidad a FSH [31]. Nuestros resultados avalan que a los 39 días de vida exista aún una disminución de la sensibilidad a esta gonadotropina. Esto se ve reflejado en la distribución por tamaño de folículos primarios y secundarios (Fig. 2F). Los folículos primarios se acumulan en los estadios más pequeños, que aún no responden a FSH. Los folículos primarios grandes, que ya responden a FSH, se encuentran disminuidos. Por otra parte el desarrollo de folículos secundarios y el número de células de granulosa dependen de la FSH, y en la distribución por tamaño de folículos secundarios evidenciamos un pobre avance hacia folículos de mayor tamaño. El mecanismo que lleva a la alteración en la sensibilidad a FSH es posiblemente una disminución en la expresión del factor neurotrófico NGF, dado que participa tanto en la diferenciación de las células mesenquimales para formar folículos primarios como en la proliferación y diferenciación de células de la granulosa para formar folículos secundarios que presentan receptores específicos para responder a FSH [25, 32]. De esta forma niveles disminuidos de NGF y la consecuente alteración en la expresión de receptores de FSH (FSHR) podría modificar la foliculogénesis provocando una acumulación de folículos primordiales y folículos primarios, además de un bajo reclutamiento hacia folículos secundarios en el grupo Estrés.

En las líneas de desarrollo folicular posterior conformado por folículos antrales sanos y atrésicos evidenciamos que la descendencia del EFCI, a los 39 días de edad, no presenta diferencias en el número de folículos antrales sanos respecto al grupo Control. Sin embargo, al realizar un distribución por tamaño se puede observar una concentración mayor de la población folicular en el rango de menor tamaño ($<200\mu\text{m}$). Además, si consideramos el recuento poblacional de folículos antrales atrésicos se evidencia un aumento importante y que a su vez presenta una distribución marcada hacia los rangos de tamaño bajos e intermedios ($<400\mu\text{m}$) y con mayores tamaños que en el grupo control. La condición de atresia esta mediada por apoptosis y esta puede ocurrir en cualquier etapa de la foliculogénesis y en roedores se ha observado que existe susceptibilidad al principio de la transición de la etapa preantral hacia antral. En ratas se ha descrito que tal condición de susceptibilidad apoptótica ocurre principalmente en folículos antrales tempranos, los

que oscilan en el rango de tamaño entre 200-400 μ m [37] y que concuerdan con los rangos obtenidos para el grupo Control y Estrés, aunque con un marcado aumento para el grupo Estrés. Nuevamente, el menor rescate de estos folículos se podría deber a una menor respuesta a FSH. Este redireccionamiento e incremento en la atresia influye en la progresión de folículos antrales viables que llegan a ovular y por lo tanto en la formación de un cuerpo lúteo. En el recuento de cuerpos lúteos para la descendencia de 39 días de edad se determinó que el número de cuerpos lúteos está fuertemente disminuido para el grupo Estrés. El incremento de la atresia disminuye el número de ovulaciones y, por lo tanto, un menor número de cuerpos lúteos lo que concuerda con los resultados obtenidos. Tanto la FSH como la hormona luteinizante (LH) son factores tróficos importantes que participan en la supervivencia y proliferación en las distintas etapas del desarrollo folicular, así como en el reclutamiento cíclico de los folículos antrales. La FSH parece ser el factor más importante para la supervivencia del folículo en las etapas tempranas del folículo antral [13], sin embargo, existen otros factores que también participan en la promoción de dicha supervivencia evitando la apoptosis. Como se describió anteriormente el NGF induce la expresión de FSHR [32], a su vez se relaciona con el establecimiento de la actividad simpática la cual a través de nervio ovárico superior (SON) alcanza la gónada [38] e induce la esteroidogénesis y la actividad proliferativa a través de su acción sobre la granulosa mediada por NA [39, 40]. La actividad simpática a nivel de ovario por estimulación de los receptores β_2 -adrenérgicos se relaciona con un incremento de AMPc y una mayor expresión de receptores de FSH, amplificando la señal gonadotrófica en los folículos [11, 32]. La supervivencia del folículo está especialmente determinada por la FSH y la respuesta mediada por FSHR, con lo cual las alteraciones descritas para las poblaciones preantrales, antrales y disminución del número de cuerpos lúteos posiblemente se deba a alteraciones en los niveles de NGF y que le suceda en una menor acción simpática mediada por NA modulando entonces la acción de la FSH en la foliculogénesis y ovulación.

En el registro de la ciclicidad estral realizado por Barra R, 2014 para el grupo Control y grupo Estrés se observa que existe un retardo en alcanzar la maduración sexual (apertura vaginal) en el

grupo estrés y además la presencia de ciclos irregulares para ambos grupos aunque más marcado para el grupo Estrés en los primeros catorce días posteriores a la maduración sexual. Nuestro trabajo reafirma la presencia de alteraciones en el desarrollo folicular y función ovárica a los 39 días de edad, para la descendencia de EFCI, que podrían estar ocasionados por alteraciones en los niveles hormonales de estrógenos que retardan el pico preovulatorio de LH retardando la maduración sexual. Además a los 39 días de edad se presenta una inmadurez de los mecanismos de regulación/secreción de hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que influye en la secreción de FSH y LH, esto debido a que la maduración del eje Hipotálamo- Hipófisis – Ovario ocurre después de la primera ovulación, y no antes, por acción de estrógenos [41]. De esta forma los mecanismos de feed-back que debieran incrementar la liberación de FSH ante una menor cantidad de folículos, aun no funcionan del todo a los 39 días, pero probablemente ya estén desarrollados y funcionando a los 60 días de edad, es decir, en una rata adulta.

2. Desarrollo folicular ovárico en ratas de 60 días de edad hijas de ratas sometidas a EFCI durante la preñez.

Una vez alcanzada la etapa de adultez en las hijas descendientes a EFCI, se evidencian valores semejantes en el recuento de folículos primordiales, primarios, secundarios, antrales y cuerpos lúteos. Aunque este resultado parece ser inesperado, creemos que tiene cierta lógica. De hecho, la ciclicidad estral en ratas del grupo estrés es similar al control entre el día 45 y 60 de edad[31]. Una de las posibles explicaciones de la normalización del desarrollo folicular a los 60 días de edad puede ser la maduración del hipotálamo y los mecanismos de feed-back descrita anteriormente [41]. Una menor cantidad de folículos lleva a una disminución de estradiol y si el hipotálamo está maduro, esto debiera inevitablemente llevar a una mayor secreción de FSH, lo que reestablecería el número de folículos en desarrollo y permitiría la transición de folículos a través de las distintas etapas. Este desarrollo folicular acelerado posterior a los 39 días de edad y previo a los 60 días de edad, permite el restablecimiento del número de folículos en desarrollo y además la utilización de un mayor número de folículos primordiales, lo que lleva a la normalización de estos, que se encontraban acumulados a los 39 días de vida. Una proyección de este trabajo sería determinar

los niveles de gonadotrofinas en el plasma en este periodo y con esto demostrar este mecanismo compensatorio. Por otra parte, el mayor número de folículos llevará a un aumento de los factores que se producen en el ovario, entre ellos NGF. Esta mayor producción de NGF puede llevar a un aumento del tono adrenérgico, lo que también puede contribuir a la normalización del desarrollo de los folículos de menor tamaño, que aún no responden a gonadotrofinas.

3. Relevancia del modelo experimental y mecanismos propuestos

Una de las preguntas relevantes en este modelo experimental, es si el estrés ocasionado en la madre es comparable al que ocurre en humanos. En humanos un tono adrenérgico aumentado está asociado de manera específica al estrés físico [42] la obesidad [43] y también la apnea del sueño [44], sin embargo, un tono adrenérgico aumentado participa en muchos tipos de estrés, asociado a otros mediadores. Nuestro modelo probablemente no representa el espectro completo de respuestas fisiológicas ante un agente estresor, sin embargo, permite analizar de manera muy precisa la influencia de un tono adrenérgico aumentado, como parte del estrés durante la gestación, en el desarrollo de la descendencia.

Otro factor importante a aclarar es el mecanismo que lleva a que el estrés simpático en la madre produzca una compensación, de forma que la hija tenga una menor cantidad de nervios o actividad simpática durante la vida posnatal, lo que contribuye a un menor desarrollo folicular. Tanto en humanos como en modelos experimentales un pequeño porcentaje de la noradrenalina atraviesa la placenta y llega a la sangre fetal [45]. En condiciones de estrés existe una gran liberación de noradrenalina, por lo que los mecanismos placentarios de metabolización podrían estar sobrepasados, llevando a un mayor paso de noradrenalina plasmática a través de la placenta. Durante el desarrollo, las fibras nerviosas que llegan al ovario en desarrollo son estimuladas por la liberación ovárica de NGF. Posiblemente, el aumento de noradrenalina en sangre fetal, permite la llegada de noradrenalina a los tejidos en desarrollo y es un freno a la liberación de NGF, ya que NGF aumenta, por ejemplo, durante una denervación y por lo tanto debiera disminuir en presencia de niveles altos de noradrenalina, que simulan la presencia de fibras nerviosas. Esto llevaría a un

menor desarrollo de las fibras nerviosas durante la vida fetal. Como demostró Barra R, 2014, existe una menor concentración ovárica de noradrenalina a los 30 días de vida, mostrando que esta menor actividad adrenérgica perdura en el tiempo, probablemente por mecanismos epigenéticos del control de la expresión génica. Aunque el mecanismo no está totalmente dilucidado, una buena proyección podría ser estudiar el paso de noradrenalina a través de la placenta y la concentración de NGF en fetos en desarrollo. Por otra parte, creemos que los mecanismos de compensación que llevan a la normalización del desarrollo folicular tienen un costo y posiblemente estos animales descendientes de ratas sometidas a EFCI sean susceptibles a sufrir mayores alteraciones si son sometidos a estrés cuando adultos en comparación con individuos controles.

Conclusión

1. La exposición a EFCI en la rata gestante produjo una disminución del reclutamiento folicular en la descendencia de 39 días de edad afectando el número de ovulaciones.
2. Una vez alcanzada la etapa adulta el desarrollo folicular vuelve a ser normal no habiendo diferencias entre el grupo Control y Estrés en ningún tipo de folículo, lo que podría sugerir que la maduración del hipotálamo contribuye a la normalización de la foliculogénesis en ratas del grupo estrés.

Referencias

1. Perdrizet, G.A., *Hans Selye and beyond: responses to stress*. Cell Stress Chaperones, 1997. **2**(4): p. 214-9.
2. Smith, A.L., et al., *The effects of acute and chronic psychological stress on bladder function in a rodent model*. Urology, 2011. **78**(4): p. 967 e1-7.
3. Gotz, A.A., M. Wolf, and V. Stefanski, *Psychosocial maternal stress during pregnancy: effects on reproduction for F0 and F1 generation laboratory rats*. Physiol Behav, 2008. **93**(4-5): p. 1055-60.
4. Herman, J.P., *Neural control of chronic stress adaptation*. Front Behav Neurosci, 2013. **7**: p. 61.
5. Barker, D.J., *In utero programming of chronic disease*. Clin Sci (Lond), 1998. **95**(2): p. 115-28.
6. Mulder, E.J., et al., *Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child*. Early Hum Dev, 2002. **70**(1-2): p. 3-14.
7. 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.
8. Pacak, K., et al., *Stressor-specific activation of catecholaminergic systems: implications for stress-related hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses*. Adv Pharmacol, 1998. **42**: p. 561-4.
9. 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.
10. Lara, H.E., et al., *Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome*. Endocrinology, 1993. **133**(6): p. 2690-5.
11. Mayerhofer, A., et al., *A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary*. Endocrinology, 1997. **138**(8): p. 3320-9.
12. Ricu, M., et al., *Functional development of the ovarian noradrenergic innervation*. Endocrinology, 2008. **149**(1): p. 50-6.
13. McGee, E.A. and A.J. Hsueh, *Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles*. Endocr Rev, 2000. **21**(2): p. 200-14.
14. Havelock, J.C., W.E. Rainey, and B.R. Carr, *Ovarian granulosa cell lines*. Mol Cell Endocrinol, 2004. **228**(1-2): p. 67-78.
15. Shivers, B.D., et al., *Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurones*. Nature, 1983. **304**(5924): p. 345-7.
16. Fox, S.R., et al., *Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary*. Neuroendocrinology, 1990. **51**(3): p. 276-83.
17. Aguado, L.I., *Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function*. Microsc Res Tech, 2002. **59**(6): p. 462-73.
18. Lara, H.E., et al., *Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: Studies on norepinephrine release*. Microsc Res Tech, 2002. **59**(6): p. 495-502.
19. Lawrence, I.E., Jr. and H.W. Burden, *The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary*. Anat Rec, 1980. **196**(1): p. 51-9.
20. Gerendai, I., K. Kocsis, and B. Halasz, *Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects*. Microsc Res Tech, 2002. **59**(6): p. 474-83.

21. Aguado, L.I. and S.R. Ojeda, *Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation.* Endocrinology, 1984. **114**(5): p. 1845-53.
22. Lara, H.E., et al., *Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats.* Endocrinology, 1990. **127**(5): p. 2199-209.
23. Lara, H.E., J.K. McDonald, and S.R. Ojeda, *Involvement of nerve growth factor in female sexual development.* Endocrinology, 1990. **126**(1): p. 364-75.
24. Bernuci, M.P., et al., *Transitory activation of the central and ovarian norepinephrine systems during cold stress-induced polycystic ovary in rats.* J Neuroendocrinol, 2013. **25**(1): p. 23-33.
25. 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.
26. D'Mello A, P. and Y. Liu, *Effects of maternal immobilization stress on birth weight and glucose homeostasis in the offspring.* Psychoneuroendocrinology, 2006. **31**(3): p. 395-406.
27. Duthie, L. and R.M. Reynolds, *Changes in the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and postpartum: influences on maternal and fetal outcomes.* Neuroendocrinology, 2013. **98**(2): p. 106-15.
28. Istvan, J., *Stress, anxiety, and birth outcomes: a critical review of the evidence.* Psychol Bull, 1986. **100**(3): p. 331-48.
29. Nimby, G.T., et al., *Maternal distress and congenital malformations: do mothers of malformed fetuses have more problems?* J Psychiatr Res, 1999. **33**(4): p. 291-301.
30. Kim, Y.J., *In utero programming of chronic disease.* Journal of Women's Medicine, 2009. **2**(2): p. 6.
31. Barra, R., et al., *Maternal sympathetic stress impairs follicular development and puberty of the offspring.* Reproduction, 2014. **148**(2): p. 137-45.
32. Romero, C., et al., *Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary.* Endocrinology, 2002. **143**(4): p. 1485-94.
33. Marcondes, F.K., F.J. Bianchi, and A.P. Tanno, *Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations.* Braz J Biol, 2002. **62**(4A): p. 609-14.
34. Barra, R., *Estrés por frío sobre la rata gestante. Cambios en la función ovárica de la progenie in Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.* 2012, Universidad de Chile.
35. Cruz, G., et al., *Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats.* Fertil Steril, 2012. **98**(5): p. 1283-90.
36. G.A., D., et al., *Neural and neurotrophic control of ovarian development,* in *The Ovary*, L. P.C.K. and A. E.I., Editors. 2004: San Diego, California. p. 6-7.
37. Hirshfield, A.N., *Development of follicles in the mammalian ovary.* Int Rev Cytol, 1991. **124**: p. 43-101.
38. Doganay, M., et al., *Superior ovarian nerve (SON) transection leads to stunted follicular maturation: a histomorphologic and morphometric analysis in the rat model.* Fertil Steril, 2010. **93**(5): p. 1711-4.
39. Dissen, G.A., et al., *Excessive ovarian production of nerve growth factor facilitates development of cystic ovarian morphology in mice and is a feature of polycystic ovarian syndrome in humans.* Endocrinology, 2009. **150**(6): p. 2906-14.

40. Dissen, G.A., et al., *Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles*. *Endocrinology*, 2000. **141**(12): p. 4736-50.
41. Andrews, W.W., J.P. Advis, and S.R. Ojeda, *The maturation of estradiol-negative feedback in female rats: evidence that the resetting of the hypothalamic "gonadostat" does not precede the first preovulatory surge of gonadotropins*. *Endocrinology*, 1981. **109**(6): p. 2022-31.
42. Wimalawansa, S.J., *Mechanisms of developing post-traumatic stress disorder: new targets for drug development and other potential interventions*. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2014. **13**(5): p. 807-16.
43. McCully, B.H., et al., *Sympathetic cardiac hyperinnervation and atrial autonomic imbalance in diet-induced obesity promote cardiac arrhythmias*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2013. **305**(10): p. H1530-7.
44. Makino, S., et al., *A case of sleep apnea syndrome manifesting severe hypertension with high plasma norepinephrine levels*. *Endocr J*, 2006. **53**(3): p. 363-9.
45. 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.