

T-379

MAYER, N. I.
Efecto del Estrés Pr

2004

60659

T. 379



60659

***EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE PARÁMETROS
NEUROENDOCRINOS E INMUNOLÓGICOS EN RATAS MACHO
ADULTAS.***

MAESTRÍA EN ANATOMÍA Y FISIOLÓGÍA VETERINARIA

Universidad Nacional De Río Cuarto

Nora Irma Mayer

Director: Dr Héctor F. Gauna

Codirector: Dra Adriana Vivas

JURADO:

**Dra Viviana Rivarola
Dra Silvia Correa
Dra María Teresa Mugnaini**

2004

02800

1977

60359

MFN:
Clasif:
T.379

DIRECTOR: Dr Héctor F. Gauna



CODIRECTOR: Dra Adriana Vivas



JURADO:

Dra Viviana Rivarola



Dra Silvia Correa



Dra María Teresa Mugnaini





Dedicada

A mi madre
porque su fuerza me hizo comprender
que lo importante es proponerse metas.

A mi padre
por su bondad y su entrega.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia: a mi esposo Heber, a mis hijos Laura, Marina, Fernanda y Nicolás, a mi sol Bruno y a Leo. Porque me dan su amor y los amo profundamente. Porque son mi orgullo y con ellos puedo compartir tristezas, alegrías y este logro.

A mis hermanas y sus familias porque representan junto a mi madre el hogar grande en el que siempre hay cobijo y una palabra de aliento.

A mis amigos Nancy, Viviana, Mabel y Guillermo porque pase lo que pase compartimos los valores y los sueños.

Entre ellos a Nancy, un agradecimiento especial, por su paz, su mano abierta para dar, por estar siempre a la par.

A Adriana Vivas, porque la vida me la puso cerca ya desde mis épocas de estudiante y siempre encontré en ella una voz que me transmitía fuerza para seguir adelante.

A mis compañeros de trabajo y a Cecilia Greco de quienes he aprendido mucho a lo largo de estos años.

Al Dr. Héctor Gauna y a los miembros del jurado por sus correcciones y sugerencias.

A la Universidad estatal, pública y gratuita que me permitió concretar un sueño que parecía casi inalcanzable.

INDICE

Resumen	1
Introducción	2
El estrés.	3
Esquema de la respuesta neuroendócrina e inmune al estrés	5
El estrés y el sistema inmune.	6
Esquema de la interacción periférica neuroendócrina e inmune frente al estrés.	10
El estrés materno y su efecto en la cría.	11
Hipótesis y objetivos	15
Material y métodos	17
Animales	17
Madres preñadas	17
Estrés	18
Diseño general de los parámetros estudiados.	18
<i>Primer experimento</i>	19
<i>Segundo experimento</i>	22
<i>Tercer experimento</i>	23
Análisis estadístico	25
Metodología	25
<i>Protocolo de la determinación de la corticosterona por RIA</i>	26
<i>Protocolo de la determinación de la glucemia</i>	29
<i>Protocolo de la extracción de las glándulas adrenales</i>	29
<i>Protocolo de la determinación de la relación corteza/médula adrenal.</i>	30
<i>Protocolo de la preparación de suspensiones de células de bazo</i>	31
<i>Protocolo de la lisis de los glóbulos rojos</i>	33
<i>Protocolo del test de viabilidad celular por exclusión con azul tripán</i>	33
<i>Protocolo del cultivo de los linfocitos del bazo</i>	34
<i>Protocolo de la determinación de la captación de [³h] timidina por las células de los cultivos del bazo</i>	35

<i>Protocolo para realizar la curva de calibración con Con-A</i>	36
<i>Protocolo de la determinación del índice esplenosomático y del número de células mononucleares /gr de bazo</i>	38
<i>Protocolo de la determinación del número de glóbulos blancos</i>	39
<i>Protocolo de la determinación de los subtipos de leucocitos</i>	40
<i>Protocolo del uso de propranolol</i>	41
Resultados	
<i>Primer experimento</i>	42
Segundo experimento	55
<i>Tercer experimento</i>	64
Discusión	71
Conclusiones	80
Perspectivas	82
Bibliografía	84
Abreviaturas	101

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: La respuesta neuroendócrina e inmune al estrés.	5
Figura 2: Esquema de la interacción periférica neuroendocrina e inmune frente al estrés.	10
Figura 3: Diseño general de los parámetros estudiados.	18
Figura 4: Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de la corticosterona plasmática.	43
Figura 5: Efecto del estrés prenatal sobre el índice adrenosomático.	45
Figura 6: Efecto del estrés prenatal sobre la relación corteza:médula adrenal.	46
Figura 7: Microfotografía de la corteza adrenal de un animal CP-C.	47
Figura 8: Microfotografía de la corteza adrenal de un animal EP-C.	47
Figura 9: Microfotografía de la corteza adrenal de un animal CP-E.	48
Figura 10: Microfotografía de la corteza adrenal de un animal EP-E.	48
Figura 11: Efecto del estrés prenatal sobre la glucemia.	49
Figura 12: Efecto del estrés prenatal sobre la proliferación de linfocitos T.	50
Figura 13: Efecto del estrés prenatal sobre el índice esplenosomático.	52
Figura 14: Efecto del estrés prenatal sobre el número de células del bazo/g de bazo.	53
Figura 15: Efecto del estrés prenatal sobre los niveles de la corticosterona plasmática.	56
Figura 16: Efecto del estrés prenatal sobre el perfil del número de los leucocitos sanguíneos.	58
Figura 17: Efecto del estrés prenatal sobre el perfil del porcentaje de los linfocitos sanguíneos.	59
Figura 18: Efecto del estrés prenatal sobre el perfil del porcentaje de los neutrófilos sanguíneos.	60
Figura 19: Efecto del estrés prenatal sobre el perfil de la relación neutrófilos/linfocitos sanguíneos.	61
Figura 20: Efecto del propranolol sobre el perfil del	

número de leucocitos sanguíneos en ratas estresadas prenatalmente	65
Figura 21: Efecto del propranolol sobre el perfil del	
Porcentaje de linfocitos sanguíneos en ratas estresadas prenatalmente	67
Figura 22: Efecto del propranolol sobre el perfil del	
Porcentaje de neutrófilos sanguíneos en ratas estresadas prenatalmente	68
Figura 23: efecto del propranolol sobre el perfil de la relación	
Neutrófilos / linfocitos sanguíneos en ratas estresadas prenatalmente	69

RESUMEN

El ambiente prenatal ejerce profundas influencias sobre el desarrollo de un organismo y puede predisponerlo a disturbios adaptativos en la vida postnatal. En el hombre, el estrés prenatal (EP) puede inducir retardo mental y disturbios del sueño en el niño, una mayor propensión a la incorporación de drogas, la alteración de la función sexual, un aumento de la incidencia del desorden de déficit de la atención con hiperactividad e hiperansiedad, efecto este último observado también en animales de experimentación. El EP en la rata produce la disminución del peso corporal, altera el eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA), la madurez sexual de los machos y el desarrollo inmunológico. El objetivo de esta tesis fue investigar el efecto de un EP físico, crónico, impredecible e inescapable, en ratas adultas, sobre la respuesta inmunológica y su relación con la actividad del HHA y del sistema nervioso simpático. Se utilizaron ratas Wistar macho, adultas, EP, en condiciones estándar de bioterio. Se estudiaron los niveles de la corticosterona (COR) plasmática, las glándulas adrenales y la glucemia. Para realizar el estudio de parámetros inmunes se determinaron los perfiles de los glóbulos blancos, la proliferación de los linfocitos T del bazo y el tamaño y el número de células de este órgano. La incidencia del sistema nervioso simpático sobre la respuesta inmune se determinó por el bloqueo de los receptores adrenérgicos β sobre los glóbulos blancos y la glucemia. Los resultados muestran que la COR plasmática basal es mayor en los EP. Cuando son expuestos al mismo estrés agudo, en la vida adulta, la COR aumenta menos que en sus controles. Además aumenta la relación corteza:médula adrenal, sin modificación del tamaño total de la glándula. La glucemia basal es mayor en los animales EP, desapareciendo esa diferencia luego del estrés agudo. El estrés agudo disminuye el número de leucocitos y linfocitos y aumenta el de los neutrófilos menos en los animales EP. La relación neutrófilo/linfocito, un indicador de estrés, es menor en los animales EP, lo que podría indicar que el estrés agudo postnatal es percibido como menos estresante por estos animales. No se modificó el peso del bazo pero aumentó el número de sus células mononucleares en los EP por lo que podría haberse producido una retención de linfocitos sanguíneos en el bazo, provocada por los mayores niveles basales de COR plasmática que favorecería la salida de estas células desde la sangre hacia otros órganos inmunes, como el bazo, a fin de ponerse, en ellos, en contacto con los antígenos. El propranolol no revirtió los cambios inducidos por el estrés sobre los glóbulos blancos, por lo cual ese efecto no se debería a la acción del sistema nervioso simpático. La proliferación de los linfocitos T es menor, en condiciones basales, en los animales EP. Frente al estrés agudo, la proliferación disminuyó menos en los EP, respondiendo posiblemente a la menor concentración de los glucocorticoides en estos animales. En conclusión, habría una alteración en la redistribución de los glóbulos blancos y una disminución en la respuesta funcional de los linfocitos T del bazo, tanto en condiciones basales como frente a un nuevo estrés. Esto podría significar no solo una reducción del abordaje de los órganos en los cuales se pondrían en contacto con el antígeno sino también de la capacidad fisiológica de responder a esos antígenos y una menor capacidad de respuesta inmunológica frente a la invasión de microorganismos al cuerpo. Además la alteración de la función inmunológica se debería, al menos en parte, a una alteración en la funcionalidad del eje HHA, el cual es hiperactivo en condiciones basales pero sufre habituación frente al mismo estrés.

INTRODUCCIÓN

El ambiente prenatal ejerce profundas influencias sobre el desarrollo de un organismo y puede predisponerlo a disturbios adaptativos en la vida postnatal, los cuales varían considerablemente, dependiendo de la naturaleza, la intensidad y la duración del estresor al que esté expuesta la hembra gestante, como así también del estadio de la gestación en el cual es aplicado el estímulo estresante.

En el hombre, el estrés prenatal puede inducir retardo mental y disturbios del sueño en el niño (Stott D. N., 1973; Schell L. M., 1981), una mayor propensión a la dependencia de drogas (Deminière y col., 1992), una alteración de la función sexual (Ward, I. L., 1972), un aumento de la incidencia en el déficit de la atención con hiperactividad (Clements, A. D., 1992) e hiperansiedad. Este último efecto también fue observado en animales de experimentación (Weinstock, M., 1997).

Según estudios realizados en nuestro laboratorio, la aplicación de estímulos estresantes durante la preñez en ratas produce en la cría, la disminución del peso corporal, afecta el eje hipotálamo-hipófiso-gonadal de los machos, repercutiendo en la madurez sexual de la mismos (Tesis doctoral, Rodríguez, N., 2000). Por otro lado se ha comprobado que el estrés prenatal altera el desarrollo inmunológico (Klein, S. y D. Rager, 1995; Coe, C. y col., 1996). De todos los aspectos estudiados, el que lo ha sido con más intensidad, es el referido a los efectos del estrés prenatal sobre el funcionamiento del sistema neuroendócrino y el comportamiento de las crías, pero poco se conoce de los efectos sobre la función inmune de las mismas (Tuchscherer, M. y col., 2002)

En este marco, resulta de fundamental importancia destacar que los sistemas neuroendócrino e inmune juegan los roles principales en la adaptación y por lo tanto en la supervivencia de los individuos (Chrousos, G. y P. Gold, 1992; Chrousos, G. 1995); habiéndose logrado reconocer vías de interrelación bidireccionales entre el sistema nervioso central (SNC) y el sistema inmunológico (SI) (Blalock, J. E., 1989; Black, P. H., 1994; Dekloet, E. R. y col., 1994; Torpy, D. J. y col., 2000).

La comprensión de los procesos de interacción de ambos sistemas frente al estrés, en un modelo tan complejo como el de la rata preñada, y sus consecuencias

posteriores en las crías, puede verse facilitado por el abordaje previo de cada uno de ellos por separado.

EL ESTRÉS

El estrés se define como un estado de desequilibrio o amenaza de la homeostasis provocado por un agente estresante (estresor) de naturaleza física, medioambiental o psicológico. Los estresores o amenazas a la estabilidad del medio interno son contrarrestados por fuerzas adaptativas del organismo, colectivamente llamados la respuesta adaptativa o inespecífica, en la cual el SNC ejerce su influencia a través del sistema central del estrés cuyos componentes son:

- a- La hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y la hormona arginina vasopresina (AVP), ambas del hipotálamo.
- b- La noradrenalina del locus ceruleus (NA-LC) y las neuronas autonómicas del sistema simpático del tallo cerebral.

Como se puede observar en la figura 1 tanto la CRH como la AVP son secretados al sistema hipotálamo portal hipofisario en respuesta a distintos tipos de estrés y actúan sobre receptores específicos en la hipófisis para liberar la hormona adrenocorticotrofina (ACTH). Ésta, estimula a su vez, la síntesis y la liberación de los glucocorticoides (GC) por parte de la corteza adrenal. Este conjunto de glándulas y hormonas interactuantes se conoce con el nombre de eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HHA). La actividad del eje HHA es inhibida por la retroalimentación negativa ejercida por los GC básicamente en tres zonas: el hipocampo, el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) y la adenohipófisis. En la rata, el principal GC secretado por la corteza adrenal es la corticosterona (COR), la cual ejerce su acción de retroalimentación negativa a través de los receptores de mineralocorticoides (RM) de alta afinidad, tipo I y de los receptores de glucocorticoides (RG) de baja afinidad, tipo II. La mayor expresión de RM y RG se encuentra en el hipocampo y se sabe que los niveles basales de COR ocupan predominantemente los RM, mientras que durante el estrés y el pico circadiano se ocupan progresivamente los receptores RG (De Kloet, E., 1995, Oitzl M. y col., 1995, Aguilera, G., 1994, Dallman, M., 1993, Young E. y col., 1995)

Con respecto a los componentes NA-LC y las neuronas autonómicas del sistema simpático central, ejercen su efecto estimulando tanto al sistema nervioso simpático sistémico (SNS) como al sistema simpático adrenomedular (SAM), los cuales producen las catecolaminas (CA): noradrenalina (NA) y adrenalina (A), en forma predominante, respectivamente. El sistema del estrés tiene una actividad circadiana basal, pero también responde a estresores físicos y emocionales, manteniendo la homeostasis basal y la relacionada al estrés. A través de las sustancias por él producidas, regula el comportamiento, el metabolismo energético y lo adapta al estrés, lo cual produce modificaciones en la glucemia, la función cardiovascular, la termogénesis y la función inmune innata y adaptativa (Chrousos, G. y P. Gold, 1992; Chrousos, G., 2000).

Por ello es relevante considerar que los estímulos estresantes se clasifican teniendo en cuenta múltiples factores. Entre ellos, si los estímulos son físicos, psicológicos o poseen ambos componentes. En este sentido Lazarus, R. (1993), ha prestado mucha atención a la valoración cognitiva de las situaciones estresantes y a la importancia de los mecanismos psicológicos (técnicas de enfrentamiento a la situación o “*coping*”) que se ponen en marcha para hacer frente a estas situaciones. Para este investigador, la respuesta emocional está siempre precedida de una valoración cognitiva de la situación que es la que determina su valor emocional y, como consecuencia, los cambios de comportamiento y fisiológicos subsiguientes. Otro aspecto que influye sobre la respuesta al estrés es la duración del mismo, criterio que permite clasificarlo en agudo y crónico. El primero consiste en la exposición del organismo al estresor una sola vez, mientras que en el segundo el estímulo se repite, ya sea en forma continua o intermitente. Otra característica que afecta considerablemente la respuesta, es la posibilidad que tiene el animal de ejercer algún tipo de control sobre la situación estresante, lo que ha permitido clasificarla en escapable e inescapable. Muchas respuestas obtenidas cuando se aplica un estímulo se deben a la imposibilidad de ejercer el control sobre el mismo y no a su nocividad real (Weiss, M., 1972; Mormède, P. y col., 1988). Finalmente, cabe destacar la importancia del momento en el que se aplica el estímulo, ya sea que el animal sea expuesto, tanto al mismo como a diferentes estresores, a la misma hora y / o días o en momentos variables (Martí, O. y A. Armario, 1998).

RESPUESTA NEUROENDÓCRINA E INMUNE AL ESTRÉS

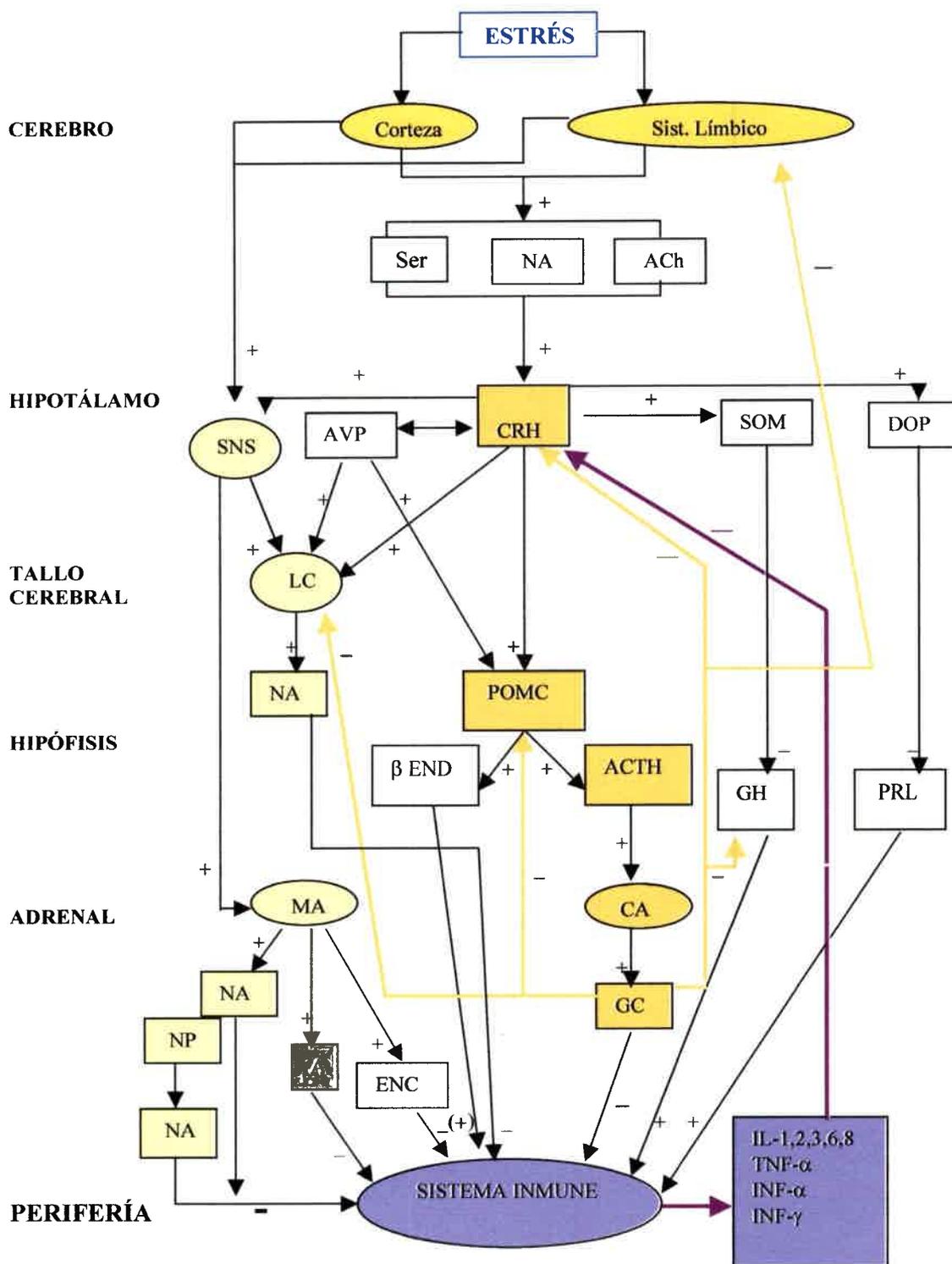


Fig.1. CRH, hormona liberadora de corticotrofina; Ser, serotonina; Ach, acetilcolina; POMC, proopiomelanocortina; SNS, sistema nervioso simpático; NA, noradrenalina; A, adrenalina; LC, locus coeruleus, AVP, arginivasopresina; DOP, dopamina; SOM, somatostatina; GH, hormona del crecimiento; PRL, prolactina; ACTH, adrenocorticotrofina; GC, glucocorticoide; β END, β endorfina; ENC, encefalina; NP, nervios periféricos; MA, médula adrenal; CA, corteza adrenal; IL, interleuquinas; INF, interferón; TNF-α, factor de necrosis tumoral-α. — SNS — eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal — Sistema Inmune Black, P. 1994

EL ESTRÉS Y EL SISTEMA INMUNE

El estrés influye sobre la respuesta inmune innata y específica, primariamente a través del sistema del estrés, que hemos descrito anteriormente. Ya Selye, en los años 30, comprobó que las glándulas adrenales influían sobre el timo y los nódulos linfáticos, disminuyendo su tamaño. Posteriormente, se encontró que los GC inhibían la proliferación linfocitaria, su migración, su citotoxicidad y suprimían la secreción de ciertas citoquinas proinflamatorias tales como la inteleuquina-2 (IL-2) y el interferón- γ (IFN- γ). Estos hallazgos condujeron a la conclusión inicial de que el estrés es, en general, inmunosupresor. Sin embargo, recientemente se ha obtenido la evidencia convincente de que la CRH, los GC y las CA, como así también otros productos del estrés, influyen en la respuesta inmune tanto en sus niveles basales, como en los niveles elevados que se producen durante el estrés.

Por otro lado, algunos cambios inmunes que amenazan la estabilidad del medio interno, pueden ser reconocidos como estresores, que activan el sistema del estrés para ayudar a recuperar la homeostasis.

Las fibras nerviosas postganglionares simpáticas productoras de NA y neuropéptido Y (NPY) inervan tanto el músculo liso de los vasos sanguíneos como el parénquima de los órganos linfoides primarios y secundarios. Posiblemente tanto la NA como el NPY liberados de estas fibras, juegan un rol en el control del flujo sanguíneo hacia estos órganos y en el tráfico de los leucocitos en los vasos. Otras fibras noradrenérgicas inervan el parénquima de los tejidos linfoides y pueden ejercer roles inmunomoduladores por alteración de la actividad local de los leucocitos. Además de la inervación por el SNS, todos los órganos linfoides reciben también inervación sensorial peptidérgica, la cual está confinada al parénquima. Esta inervación puede ejercer efectos inmunomoduladores a través de los cambios en la degranulación de los mastocitos dentro del parénquima de los órganos linfoides (Chrousos, G., 2000).

La respuesta inmune específica requiere, para ser efectiva, de una cerrada cooperación entre los linfocitos B, los cuales son responsables de la elaboración y la secreción de los anticuerpos y los linfocitos T, responsables de la inmunidad mediada por células. Los linfocitos T que están involucrados en esta cooperación son conocidos

como células T colaboradoras (Th). Ellos existen en dos subtipos, los cuales se diferencian por las linfoquinas que producen. Los linfocitos Th1 producen principalmente IL-2 e IFN- γ , los cuales estimulan adicionalmente el crecimiento celular y la activación de los macrófagos. Los linfocitos Th2 producen principalmente interleuquina-4 (IL-4) e interleuquina-10 (IL-10) las cuales desactivan macrófagos y estimulan a las células B a multiplicarse y diferenciarse en células plasmáticas, las cuales secretan los anticuerpos. “*In vivo*”, algunas respuestas inmunes se inician como Th1 y finalmente cambian a Th2. Los GC parecen ser parte de los mecanismos que conducen el cambio de una respuesta Th1 a una Th2, lo que generaría una disminución de la inmunidad mediada por células (Dantzer, R., 1997). Estas hormonas inhiben, además, la expresión de las moléculas de adhesión sobre la superficie de las células inmunes por un mecanismo de alteración de la velocidad de transcripción de genes que responden a ellas o por cambios en la estabilidad de los ARNm de varias proteínas involucradas en la inflamación (Chrousos, G., 2000).

En fin, el efecto del estrés sobre la inmunidad celular o humoral de los organismos, estaría mediado por una acción coordinadora del SNC sobre las vías nerviosas simpáticas y el eje HHA, ambos de gran importancia en la regulación “*in vivo*” de la función inmune.

Los efectos del estrés sobre la respuesta inmune mediada por células pueden incluir:

- a- Alteración en las reacciones de hipersensibilidad retardada (Blecha, F. y col., 1984).
- b- Reducción en la proliferación de los linfocitos T inducida por mitógenos y disminución de la actividad de los NK (Keller, S. y col., 1981; Jain, A. y col., 1991).
- c- Cambios en el tráfico celular de los linfocitos y los neutrófilos (Dhabhar, F. y col., 1995; Mizobe, K. y col., 1997).

Por otro lado, los efectos sobre la respuesta humoral podría implicar:

- a- La alteración en la producción de inmunoglobulinas (Ig) (Margni, R., 1996).
- b- La disminución en la proliferación inducida por mitógenos, de los linfocitos B del bazo y de la sangre periférica, (Nelson, C. J. y D. T. Lysle, 1998)

La respuesta inmune obtenida frente a una situación de estrés, depende de muchos aspectos que deben ser tenidos en cuenta, ya que la naturaleza precisa de los efectos

observados depende del tipo de respuesta inmune, de las características físicas y psicológicas de los estresores y del momento en que se produce el estrés, relacionado a la inducción y expresión de los eventos inmunes (Dantzer, R. y K. Kelley, 1989).

Estudios anatómicos han revelado una extensa presencia de fibras nerviosas simpáticas noradrenérgicas que inervan los vasos y el parénquima rico en linfocitos y macrófagos de los órganos linfoides primarios y secundarios (Felten, D. y col., 1987, Chrousos, G. e I. Elenkov, 2000). Esta evidencia de la comunicación entre el SNC y el sistema inmune, sugiere que el desarrollo de este último puede ser influenciado por el SNS (Dantzer, R., 1997), habiéndose informado que la liberación de NA en el bazo alcanza los niveles del adulto, entre los 56 y 90 días de edad de la rata, aproximadamente (Ackerman, K. y col., 1991).

Estudios llevados a cabo por diversos autores, muestran un efecto del SNS sobre los parámetros de la inmunidad celular. Así, la administración de nadolol, un antagonista de los receptores adrenérgicos beta, revirtió la supresión de la proliferación de los linfocitos B y T, en ratas sometidas a estrés quirúrgico (Nelson, C. J. y D. T. Lysle, 1998). Por otra parte, Irwin, M. (1994) logró revertir la supresión de la citotoxicidad de los NK inducida por la infusión de CRH, mediante la administración intraperitoneal de antagonistas de los receptores adrenérgicos beta, (tanto del antagonista adrenérgico beta no selectivo, propranolol, como del antagonista adrenérgico selectivo beta-2, butoxamina). Esto sugiere que la activación aguda del SNS deprimiría la función inmune celular a través de mecanismos mediados por los receptores adrenérgicos beta 2, presentes en los linfocitos. Por su parte, Sudo, N. y col. (1997) hallaron que el SNS está involucrado significativamente en los cambios de la distribución de las células inmunes, cuando las ratas son sometidas a estrés por restricción de movimiento. Esta posibilidad también ha sido propuesta por Bauer, M., y col. (2001), quienes sugieren que las CA pueden ser responsables, en parte, de la extravasación de los linfocitos hacia los tejidos luego de un estrés agudo.

Sin embargo, estudios realizados por Dhabhar, F. S. y col. (1995 y 1996), sugieren que las hormonas del eje HHA liberadas durante el estrés agudo, modulan el tráfico de los leucocitos y producen una redistribución de los leucocitos entre la sangre y otros compartimentos inmunes. En este sentido, demostraron que el aumento de la

COR plasmática, inducido por el estrés agudo, se acompaña por una significativa disminución en el número y la proporción de los linfocitos en el timo, en el bazo y en la sangre periférica; y un aumento en el número y proporción de los neutrófilos sanguíneos. Estos efectos fueron revertidos por adrenalectomía. Se postula que los linfocitos salen del torrente sanguíneo y se dirigen hacia distintos órganos y regiones del cuerpo a vigilar la zona afectada y a ponerse en contacto con los antígenos. Por otro lado, se ha demostrado que altos niveles de COR disminuyen la respuesta mitogénica de los linfocitos T de la sangre periférica, mientras que bajos niveles de la hormona tienen efectos estimulatorios (Wieggers, G., 1993).

Además, se ha comprobado, que tanto la vía simpática como la del eje HHA activadas durante el estrés poseen mecanismos de retroalimentación ejercidos por el SI sobre el SNC, cuyo objetivo es regular la respuesta desencadenada durante el estrés (Kennedy, S. y A. C. Collier, 1994; Laudenslager, L y col., 1983; von Hoersten, S. y col., 1993). En este sentido, está claramente demostrado que las citoquinas proinflamatorias tales como la IL-1, IL-6 y el TNF- α , que son liberados de las células del sistema inmune durante la activación del mismo, pueden afectar la función del SNC (Black, P. H., 1994; Dantzer, R., 1997). En general, los datos sugieren que las citoquinas estimulan la liberación de CRH hipotalámico, lo cual resulta en un aumento de la liberación de glucocorticoides y una mayor actividad del SNS eferente, cuyos efectos son la disminución de la activación del SI y de la producción de niveles incrementados de citoquinas por el mismo (Black, P. H., 1994; Dekloet, E. R. y col., 1994; Torpy, D. J. y col., 2000). Esta retroalimentación, se realiza sobre los macrófagos y las células mononucleares activados, generando un “*down-regulation*” de la síntesis de las citoquinas proinflamatorias (Besedovsky, H. O. y col., 1986). *In vitro*, Platzer, C. y col. (2000), demostraron que las CA estimulan directamente la liberación de la IL-10 antiinflamatoria, en células monocíticas, lo cual es coincidente con los hallazgos de una asociación entre la activación del SNS y la liberación de la IL-10, *in vivo*, seguida de inmunosupresión.

Los principales aspectos explicados en las páginas anteriores se muestran en la figura 2.

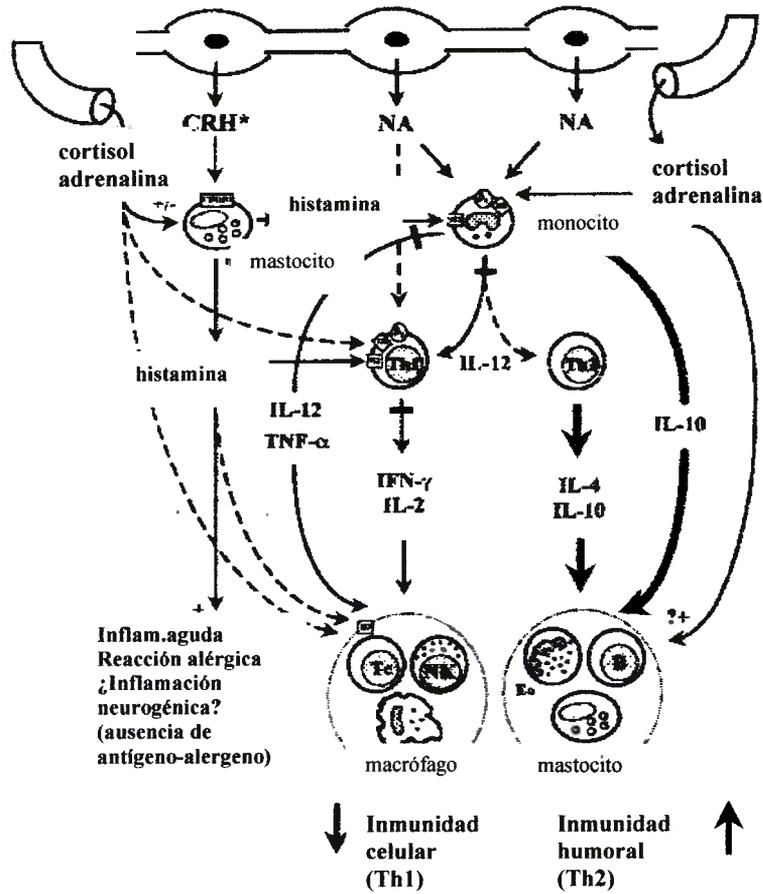


Fig. 2. Efecto de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) e histamina de los mastocitos, glucocorticoides y catecolaminas sobre el balance Th1/Th2 y en consecuencia sobre la inmunidad humoral y celular. La influencia del estrés y el CRH sobre las respuestas inflamatoria-inmune y alérgica por la estimulación de la secreción de los glucocorticoides, las catecolaminas y del CRH periférico (inmune) y por alteración de la producción de citoquinas regulatorias claves e histamina. El CRH* también se libera de nervios sensitivos cuando son activados. Las líneas sólidas representan estimulación y las líneas cortadas representan inhibición. Abreviaturas: CRH, hormona liberadora de corticotrofina periférica (inmune); NA, noradrenalina; NK, células natural killer o asesinas naturales; GR, receptor de glucocorticoides; T, linfocito T; B, linfocito B; Th, linfocito helper o colaborador; Tc, linfocito T citotóxico; Eo, eosinófilo; IL, interleuquina, TNF, factor de necrosis tumoral; IFN, interferón. Elenkov, I. And Chrousos, 2000.

EL ESTRÉS MATERNO Y SU EFECTO EN EL SISTEMA NEUROENDÓCRINO E INMUNE DE LA CRÍA.

Teniendo en cuenta que no hay una conexión neural directa entre el feto y la madre, cualquier cambio en el sistema neuroendócrino del feto inducido por estrés materno, se espera esté mediado por las hormonas de la madre. Estas hormonas son COR, CA, ACTH y β -END, entre otras. La COR materna es secretada a la sangre, alcanza la placenta, y desde allí llega a los tejidos periféricos y al cerebro fetal (Zarrow, M. y col., 1970; Fisher, L. y M. Brown, 1991). En este sentido, se ha demostrado que cuando se expone a la hembra preñada a un estrés por restricción de movimiento, se produce un aumento de tres a cuatro veces en la cantidad de la COR plasmática (Barlow, S. M. y col., 1978) y que la exposición repetida a un estrés incontrolable por restricción de movimiento y shock eléctrico, aplicado diariamente durante toda la gestación, produce una prolongación en el tiempo de esos niveles elevados de la hormona. (Koehl M. y col., 1999). Estos resultados, junto a los hallazgos de que el estrés crónico induce la reducción de los niveles circulantes de la globulina fijadora de corticosteroides (CBG) maternos, sugieren un aumento en los niveles plasmáticos de la COR libre, habiéndose encontrado luego del estrés materno, una correlación positiva entre los niveles de la COR plasmática materna y fetal (Takahashi, L. y col., 1998).

Una serie de estudios realizados en las crías de roedores y de primates no humanos, adultos, estresadas prenatalmente (EP) con diferentes tipos de estresores, revelaron una alteración en la regulación del eje HHA de las mismas. En este sentido, se ha demostrado que las ratas EP tienen niveles significativamente mayores de CRH en la amígdala y muestran una mayor liberación de este péptido en respuesta al estrés (Cratty, M. S. y col., 1995). Por otro lado, los hijos de las madres expuestas a un estrés incontrolable durante la preñez, tienen significativamente mayores concentraciones plasmáticas de ACTH (Takahashi, L. y col., 1988 y 1990).

Existen resultados dispares en referencia a los niveles de los glucocorticoides producidos por la glándula adrenal, en crías de ratas y monos rhesus estresadas prenatalmente. Algunos autores encuentran que en condiciones basales, las mismas poseen mayores niveles de COR que sus controles (Clarke, A. y col., 1994; Fride, E., y

col., 1986; Peters, D., 1982), mientras que otros autores no encuentran estas diferencias (Barbazanges, A. y col., 1996; Henry, C. y col., 1994; Maccari, S. y col., 1995; Takahashi, y col., 1992). La actividad del SNS fue mayor en los animales EP, ya que Weinstock, M. y col. (1998) encontraron mayores niveles de NA y dihidroxifenilglicol (DHPG).

Por otro lado, hay un creciente cuerpo de evidencias de que el estrés aplicado durante la preñez en ratas puede alterar la regulación neuroendócrina y comportamental frente a un nuevo estrés en las crías adultas. Así, se han encontrado resultados contradictorios, ya que se ha determinado que el estrés prenatal produce en algunos casos niveles disminuidos de la COR plasmática (Ader, R. y S. Plaut, 1968; Pollard, I., 1984; Williams, M. y col., 1999) en otros similares (Takahashi, y col., 1992; Stöhr, y col., 1998) y en otros aumentados (Henry, C. y col., 1994; Peters, D., 1982; Weinstock, M. y col., 1992 y 1996; Takahashi, y col., 1991; Maccari, S. y col., 1995; McCormick, C. y col., 1995; Fride, E. y col., 1986; Vallée, M. y col., 1997; Barbazanges, A. y col., 1996), hecho que debe ser estudiado con más profundidad.

Otro hallazgo importante ha sido que el EP afecta el ritmo circadiano del HHA, ya que las crías de ambos sexos, estresadas prenatalmente por restricción, presentaron mayores niveles de secreción de COR, tanto total como libre al final del período de luz. Además, se observó hipercorticismismo en el ciclo diurno completo, en las hembras. Estos resultados se produjeron sin la existencia de fluctuaciones diurnas de la ACTH en ninguno de los grupos (Koehl, M. y col., 1999).

Uno de los mecanismos por los cuales se podría generar la hiperactividad del HHA en los animales EP, involucraría la acción de los elevados niveles de los glucocorticoides de la madre sobre el feto, en el momento en que el eje HHA del mismo se está desarrollando. Esto ocurre entre los días 17 al 19 de la gestación y podría tener marcadas repercusiones a largo plazo en los animales EP, disminuyendo la eficiencia de los mecanismos de retroalimentación negativos sobre el eje HHA lo cual resultaría en una hiperactividad basal del mismo (Barbazanges, M. y col., 1996). Además, es necesario destacar, que varios estudios en los que se utilizaron diferentes tipos de estresores o el tratamiento con dexametasona en ratas preñadas, demostraron que la respuesta al EP sobre la función del eje HHA es diferente en las crías hembras que en

las crías machos (McCormick C. M. y col., 1995; Weinstock, M. y col., 1992; Weinberg, J., 1991; Li Liu y col., 2001).

A su vez, en estudios de Reul, J.M. y col. (1994) en los que se estimula la respuesta inmune celular durante la preñez, se inducen anormalidades en la función del eje HHA en las crías adultas, de lo que podemos sugerir una homeostasis bidireccional entre ambos sistemas.

El bloqueo de la secreción de COR materna, inducida por estrés durante la gestación, mediante la adrenalectomía con tratamiento sustitutivo de COR, suprime la respuesta prolongada de la COR inducida por estrés observada en adultos EP. Además la administración de COR a estas madres, en cantidades semejantes a las producidas por el estrés, reinstala los efectos inducidos por el EP (Barbazanges M. y col., 1996).

Por otro lado, los hallazgos de mayores niveles de NA y de dihidroxifenilglicol (DHPG), en ratas adultas EP por efecto de choques eléctricos intermitentes, indican una mayor activación del SNS en respuesta a un nuevo estrés (Weinstock, M. y col., 1998). Esto demostraría que el estrés prenatal también induciría cambios a largo plazo en la sensibilidad del SNS, los cuales se evidencian al exponer al animal a un nuevo estrés.

Como podemos ver, los efectos del EP sobre el sistema neuroendócrino de las crías han sido estudiados extensamente pero se conoce poco de los efectos del EP sobre la función inmunológica de las mismas (Tuchscherer, M. y col., 2002). Además los resultados varían considerablemente, dependiendo de una diversidad de factores tales como el tipo y duración del estrés, parámetros inmunológicos estudiados, momento y predecibilidad de la aplicación del estímulo estresante, edad de la cría, sexo, etc.

La alteración de la función inmune de crías EP podría implicar mecanismos que involucran la acción directa de las hormonas del estrés materno sobre las células inmunes del feto en un momento crítico de su diferenciación (Kay, G. y col., 1998).

En vista de la variedad de los resultados informados en la bibliografía consultada, referidos a los efectos del EP sobre el SI, la siguiente pretende ser una síntesis orientadora de los mismos. Cuando se usó etanol como EP, en las ratas, no se obtuvieron modificaciones, en condiciones basales en:

- El número de células mononucleares del bazo
- La respuesta de los linfocitos del timo a la acción de la IL-2

- La proliferación de los linfocitos B
- La producción de IL-2 (Weinberg, J. y T. R. Jerrells, 1991).

Mientras que sí se obtuvieron diferencias significativas en los siguientes parámetros, medidos por los mismos autores:

- La disminución del número de linfocitos del timo
- La disminución de la proliferación de los linfocitos T del bazo
- La disminución de la producción de IgG frente a la exposición prenatal a estrés inescapable (Sobrian, S. y col., 1997).
- La disminución de la proliferación de linfocitos T, en machos, pero no en hembras, tratados con dihidroepiandrosterona (DHEA) *in útero* (Shelat, S. y col., 1997).
- La disminución en la producción de IL-6 y TNF- α (Coe, C. y col. 2002).

En otros estudios se determinaron los efectos de un estrés postnatal en los animales EP. Así, la proliferación de los linfocitos B del bazo fue menor frente a un estrés postnatal por shock eléctrico en la cola, en las ratas EP por medio de ruido y flashes de luz aplicados 3 veces / semana. Esta disminución fue mayor en las hembras que en los machos (Kay, G. y col., 1998). Sin embargo, la aplicación de estrés postnatal por frío en ratas EP con etanol, produjo un aumento de la proliferación de los linfocitos B, en las ratas hembras pero no en los machos (Giberson, P. K. y col., 1997). Con respecto a la producción de inmunoglobulinas, también muestra resultados dispares, ya que, aunque en general la disminución de la producción de inmunoglobulina G (IgG) es el resultado obtenido con mayor frecuencia, el efecto fue el opuesto en los machos EP mediante shock eléctrico inescapable o no se obtuvieron diferencias en este parámetro cuando se utilizó un EP psicológico (Sobriana, S. y col., 1992).

Giberson, P. K. y col. (1997) encontraron que la proliferación de los linfocitos T aumentó significativamente en las hembras pero no en los machos, mientras que Weinberg, J. y T. R. Jerrells (1991), usando etanol tanto en las hembras preñadas como postnatalmente en sus crías, obtuvieron una disminución en esta proliferación, en los machos pero no en hembras. Por su parte, trabajos realizados por Kay, G. y col. (1998), muestran solo una tendencia a la disminución en la proliferación de los linfocitos T del bazo, la cual fue mayor en los machos que en las hembras.

Estos mismos autores estudiaron la citotoxicidad de los linfocitos NK en el bazo y en la sangre periférica y en ellos encontraron una disminución significativa de este parámetro en los animales EP, sometidos al estrés postnatal por shock eléctrico.

Por otro lado, la producción de IL-6 y de TNF- α por los linfocitos de la sangre disminuyó en monos, usando el mismo estrés pre y postnatal (Coe, C. y col. 2002).

Como podemos ver, son muchos los factores involucrados en las diferentes respuestas a un tipo de estrés y dentro de ellos juegan un rol fundamental la especie, el género y la edad de los animales utilizados.

Sobre la base de estos antecedentes se plantearon la hipótesis y los objetivos siguientes:

HIPÓTESIS

Las ratas estresadas prenatalmente manifiestan una alteración en la reactividad de su eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, en su sistema nervioso simpático y en la respuesta inmunológica, durante la vida adulta.

OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto de un estrés prenatal físico, crónico, imprevisible e inescapable, en las crías macho adultas, sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, del sistema nervioso simpático y su relación con la respuesta inmunológica, luego de una exposición aguda al mismo estrés.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Investigar el efecto de un estrés prenatal físico, crónico, imprevisible e inescapable, en las crías macho adultas, sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal luego de una exposición aguda al mismo estrés.

Investigar el efecto de un estrés prenatal físico, crónico, imprevisible e inescapable, en las crías macho adultas, sobre la influencia del sistema nervioso simpático en parámetros inmunes y metabólicos, luego de una exposición aguda al mismo estrés.

Investigar el efecto de un estrés prenatal físico, crónico, imprevisible e inescapable, en las crías macho adultas, sobre parámetros inmunológicos, luego de una exposición aguda al mismo estrés.

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales

Para la realización de este trabajo se usaron ratas albinas, Wistar, macho, de 3 a 4 meses de edad, de 300–350 g de peso corporal (PC), hijos de madres sometidas a estrés por inmovilización en plancha (IMO) (Bertuzzi y col., 2003) durante 30 minutos, tres veces por semana, en días variados, durante las dos últimas semanas de preñez (EP) y utilizando como controles a animales no estresados (CP). A todos los animales se los mantuvo en condiciones estándar de bioterio (período de luz desde las 7.30 hasta las 19.30 hs y temperatura 20 ± 2 °C) y se les suministró agua y alimento “*ad libitum*”. Luego del nacimiento se dejaron 8 crías por camada. El destete fue realizado a los 21 días postnacimiento. En ese momento se eligieron al azar 4 machos por camada a fin de poder extraer 2 de ellos para cada grupo experimental, evitando el “efecto camada” (Chapman, R. H. and J. Stern. 1978), los cuales fueron alojados juntos en una misma caja. Siete días antes del experimento, a fin de evitar su manipulación en los momentos previos al mismo, se colocaron los animales en cajas individuales. Una misma persona limpió las cajas y alimentó los animales, evitando otro tipo de estímulo.

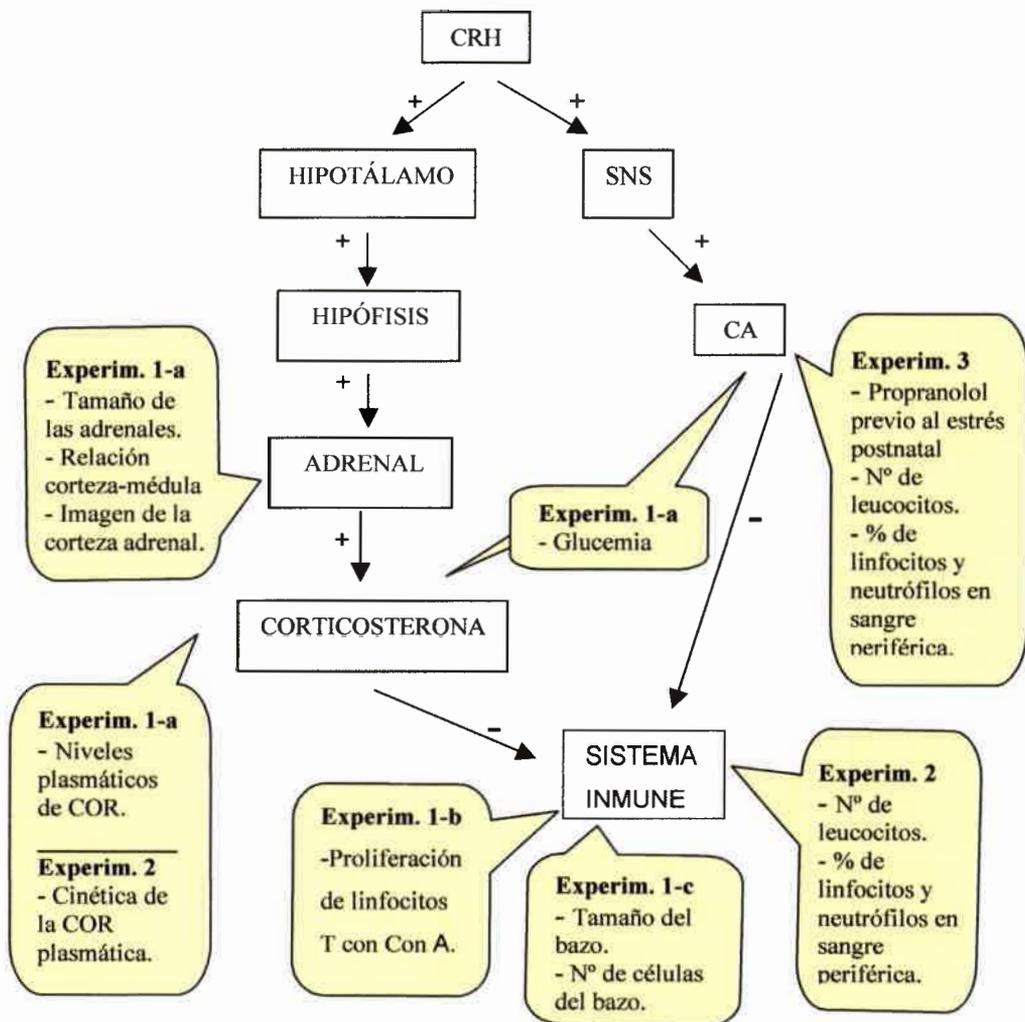
Madres preñadas

Las hembras fueron apareadas en jaulas grandes en proporción de 3 hembras por un macho. Todos los días entre las 9:00 y 11:00 hs, a cada hembra se le extrajo material vaginal que se analizó al microscopio, a los fines de determinar la presencia de espermatozoides, provenientes de la cópula del macho, durante las horas de oscuridad del bioterio. Las hembras que tenían espermatozoides en el exudado vaginal fueron separadas en jaulas individuales, fijándose este día como el día de la fecundación ó primer día de la preñez.

Estrés

La sesión de estrés consistió en la inmovilización del animal en una plancha constituida por una tabla de madera de 20 x 20 cm, con 4 cuatro soportes metálicos apoya-miembros en sus ángulos, a los cuales se sujetan las patas del animal colocado en decúbito ventral, con cinta hospitalaria (Michajlovskij, N. y col., 1988)

DISEÑO GENERAL DE LOS PARÁMETROS ESTUDIADOS



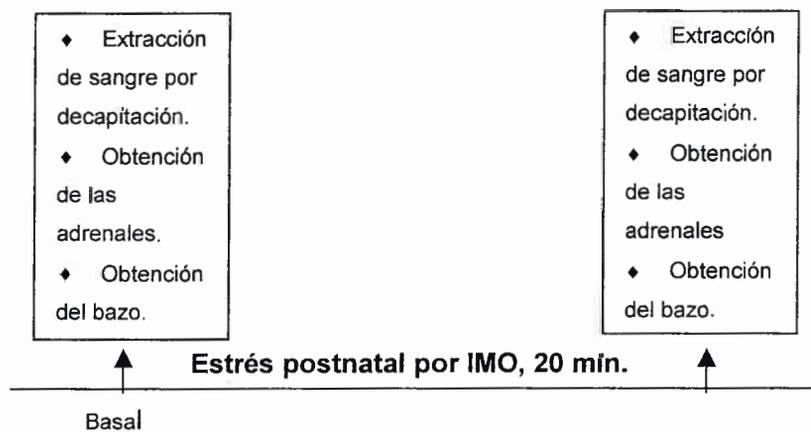
DISEÑO EXPERIMENTAL

El día del experimento, se formaron dos grupos de animales: los EP y los CP, conformados cada uno de ellos con animales provenientes de diferentes camadas (dos de cada camada), con los cuales se realizaron los siguientes experimentos:

Primer experimento

Para llevarlo a cabo se realizó el siguiente diseño experimental:

ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL



a- Para demostrar los efectos del EP sobre la función neuroendócrina de la cría, se determinaron los niveles plasmáticos de corticosterona y glucosa y se obtuvieron los índices adrenosomáticos, la relación corteza-médula adrenal y se observaron las imágenes de la corteza adrenal.

Para ello, tanto los animales EP como los CP adultos fueron divididos en dos grupos, los cuales recibieron los siguientes tratamientos postnatales:

Grupo E : una sesión de estrés por IMO durante 20 minutos (de 10 a 10.20 a.m).

Grupo C: no fueron sometidos a estrés, manipulándoselos de la misma manera y luego dejándolos en sus jaulas individuales.

De estos tratamientos surgieron los siguientes grupos: **CP-C, CP-E, EP-C y EP-E.**

CP-C: ratas hijas de madres no estresadas, sin estrés postnatal.

CP-E: ratas hijas de madres no estresadas, sometidas a una sesión de estrés por IMO postnatal durante 20 minutos (de 10 a 10.20 a.m).

EP-C: ratas hijas de madres estresadas, sin estrés postnatal.

EP-E: ratas hijas de madres estresadas, sometidas a una sesión de estrés por IMO postnatal durante 20 minutos (de 10 a 10.20 a.m).

Para llevarlo a cabo se realizó el siguiente diseño experimental.

Finalizado el tratamiento correspondiente, se sacrificaron los animales por decapitación a fin de obtener muestras de sangre en tubos heparinizados. Este procedimiento se realizó en una sala contigua, teniendo la precaución de no exponer a los otros animales al olor de la sangre para evitar un estrés adicional. Con el plasma de dicha sangre, se determinó la concentración de COR plasmática por radioinmunoensayo (RIA) (Krey y col., 1975). La sensibilidad de este ensayo fue de 10 pg of COR, y los coeficientes de variabilidad inter e intra-ensayo fueron < 10%.

Por otro lado, se determinó la glucemia en todas las muestras, mediante un equipo comercial enzimático de Wiener.

La obtención de las muestras se realizó en todos los casos antes de 2 minutos de extraído el animal de su jaula o de la plancha de IMO a fin de no modificar, por la manipulación, los niveles de las variables estudiadas.

Además, a todos los animales se les extrajeron las adrenales para obtener con ellas el índice adrenosomático, que relaciona el peso de ambas adrenales con el peso corporal del animal, según la siguiente ecuación:

$$\text{Índice adrenosomático} = [\text{Peso de las adrenales (g)} / \text{Peso corporal (g)}] \times 1000$$

Finalmente, ambas adrenales fueron fijadas en formol bufferado al 10 % a fin de determinar posteriormente en ellas la relación corteza-médula y obtener las imágenes de la corteza adrenal, mediante la técnica histológica convencional, con la tinción de hematoxilina-eosina. Las mediciones se efectuaron mediante un microscopio Zeiss asociado a un VIDAS-KONTRON.

b- Para demostrar el efecto del EP sobre la proliferación de los linfocitos, se realizaron los **cultivos de los linfocitos del bazo estimulados con Concanavalina-A.**

Para ello, se utilizaron animales que recibieron los mismos tratamientos que los empleados en el experimento 1-a, los cuales fueron agrupados de igual manera como grupos **CP-C, CP-E, EP-C y EP-E.**

Una vez finalizado el tratamiento postnatal correspondiente, los animales fueron decapitados a fin de extraerles el bazo bajo condiciones de esterilidad. Luego de obtenido el órgano, se realizaron las pruebas de proliferación linfocitaria en cultivos desafiados con una lectina estimulante de la proliferación de linfocitos T, la concanavalina-A (Con-A), durante 72 horas. La magnitud de la proliferación linfocitaria se determinó mediante la cuantificación de la captación de [³H] timidina por las células de los cultivos del bazo.

c- Para comprobar el efecto del EP sobre el tamaño del bazo se determinó el **índice esplenosomático y el número de células mononucleares del bazo / peso de bazo.**

Cuatro días antes del experimento se pesaron todos los animales, tanto los CP como los EP. El día del experimento se los sacrificó por decapitación, antes y después de la sesión de IMO agudo de 20 minutos, a fin de extraerles el bazo y pesarlo para calcular el índice esplenosomático de acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{Índice esplenosomático} = [\text{Peso del bazo (g)} / \text{Peso corporal (g)}] \times 1000$$

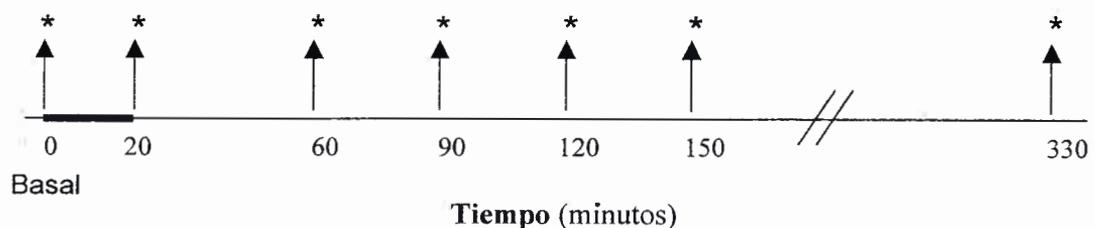
Luego se hizo un recuento en una cámara de Neubauer, de la cantidad de células del órgano/ml de suspensión celular, obtenida por compresión del órgano a través de una malla con poros de 200 nm. Con este dato se obtuvo el número de células mononucleares / g de bazo.

Segundo experimento

Para demostrar el efecto del EP sobre la distribución de los leucocitos, se realizó la determinación de la **cantidad de glóbulos blancos y el porcentaje de los subtipos de leucocitos**, correlacionados con la concentración de COR en la sangre periférica.

Para llevar a cabo este experimento se realizaron medidas repetidas en los animales EP y sus controles, según el siguiente diseño experimental.

ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL



* Extracción de sangre

Se recogieron las muestras de sangre periférica, en un volumen de 100 a 200 μ l, mediante un pequeño corte en la cola de las ratas, inmediatamente después de extraídos los animales de su jaula para hacer la determinación basal (0 minutos). Luego se los sometió al IMO durante 20 minutos. Finalizado el mismo, se les extrajo sangre a todos los animales inmediatamente (20 minutos), a partir de la misma herida de la cola, y luego a los 60, 90, 120, 150 y 330 minutos de iniciado el estrés. A cada muestra de sangre se le hizo el recuento de glóbulos blancos en la cámara de Neubauer y se le determinó la fórmula leucocitaria relativa por medio del examen microscópico de 200 células coloreadas con el método de May Grünwald-Giemsa. En las mismas muestras se determinaron los niveles plasmáticos de COR por RIA.

Tercer experimento

Para determinar el efecto del estrés prenatal sobre la influencia del Sistema Nervioso Simpático en la cantidad de glóbulos blancos y los subtipos de leucocitos en la sangre periférica se estudió el **efecto del bloqueo de los receptores adrenérgicos β con propranolol administrado previo al estrés postnatal,**

Para ello, los animales EP, fueron divididos en cuatro grupos, los cuales recibieron los siguientes tratamientos postnatales:

Grupo EP-B-E: se les inyectó intraperitonealmente 4mg/kg del antagonista adrenérgico β selectivo, propranolol (Bertuzzi, M. y col., 2003), 15 minutos antes de la sesión de estrés por IMO en plancha durante 20 minutos (de 10 a 10.20 hs).

Grupo EP-B: se les inyectó intraperitonealmente 4mg/kg del antagonista adrenérgico selectivo β , propranolol, a las 9.45 hs., manteniéndose los animales en su jaula sin ser sometidos a estrés.

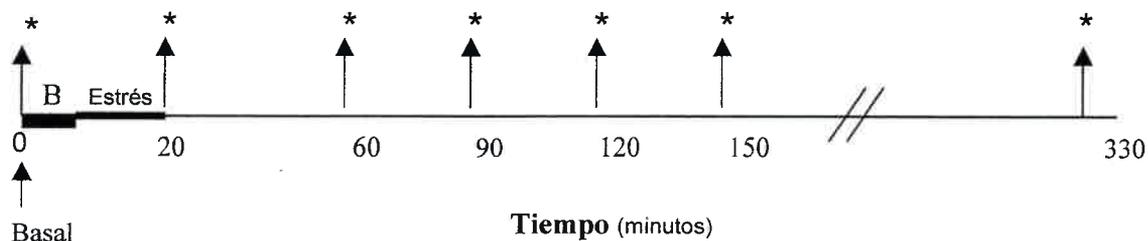
Grupo EP-V-E: se les inyectó intraperitonealmente 4mg/kg del vehículo del bloqueante, 15 minutos antes de la sesión de IMO durante 20 minutos (de 10 a 10.20 hs).

Grupo EP-V: se les inyectó intraperitonealmente 4mg/kg del vehículo del bloqueante, CINA al 0,9 %, a las 9.45 hs, manteniéndose los animales en su jaula sin ser sometidos a estrés.

B: es el bloqueante adrenérgico β selectivo, propranolol.

V: es el vehículo del propranolol, una solución de CINA al 0,9 %.

ESQUEMA DEL DISEÑO EXPERIMENTAL



* Extracción de sangre

B = propranolol

Inmediatamente después de extraídos los animales de su jaula, se les extrajo 100 a 200 μ l de sangre periférica mediante un pequeño corte en la cola, para hacer la determinación basal (0 minutos). Luego se les administró el propranolol o su vehículo y 15 minutos después se los sometió a IMO durante 20 minutos. Finalizado el mismo, se les extrajo sangre a todos los animales inmediatamente (20 minutos), a partir de la

misma herida de la cola, y luego a los 60, 90, 120, 150 y 330 minutos de iniciado el estrés. A cada muestra de sangre se le hizo el recuento de glóbulos blancos en la cámara de Neubauer y se le determinó la fórmula leucocitaria relativa por medio del examen microscópico de 200 células coloreadas con el método de May Grünwald-Giemsa.

Análisis estadístico

Para analizar estadísticamente los resultados del experimento 1 referidos a los niveles de la COR plasmática, la glucemia, los cultivos celulares, el índice esplenosomático y el número de células mononucleares / g de bazo, se usó un ANOVA de dos vías: tratamiento de la madre (estrés prenatal) y tratamiento de la cría (estrés agudo). Cuando correspondió usar un test “a posteriori” se empleó el test de Duncan.

Para estudiar estadísticamente los resultados del índice adrenosomático y de la relación corteza:médula adrenal se usó un ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (estrés prenatal).

Para realizar el análisis estadístico de los experimentos 2 y 3 en sangre periférica (el número de glóbulos blancos totales, los porcentajes de los subtipos de leucocitos, los niveles de COR, así como los referidos al efecto del bloqueante propranolol, se usó MANOVA de medidas repetidas de dos vías: tratamiento de la madre (estrés prenatal) y tiempo. Cuando correspondió usar un test “a posteriori” se empleó el test de Duncan.

METODOLOGÍA

Primer experimento

a- Determinación de los niveles plasmáticos de corticosterona y de glucosa; obtención de los índices adrenosomáticos, de la relación corteza-médula adrenal y de imágenes de la corteza adrenal.

Obtención de las muestras de sangre para la determinación de la COR y la glucemia.

El día del experimento se sacrificaron los animales por decapitación y se obtuvo la sangre que fue colocada en tubos heparinizados dentro de un recipiente con hielo.

Uno de los tubos (cuya sangre se obtuvo en el término de dos minutos) se centrifugó inmediatamente a 3000 rpm durante 15 min y se separó el plasma, el cual se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, hasta la realización de las determinaciones de COR por RIA y de glucosa mediante el uso de un método colorimétrico.

Determinación de la COR por RIA:

Protocolo:

Reactivos del análisis

- Etanol absoluto
- Fosfato monosódico y Fosfato disódico
- Gelatina
- Cloruro sódico
- Hidróxido de sodio (granallas)
- Líquido de centelleo comercial HiSafe 3 (Perkin Elmer)

Reactivos específicos

- Buffer fosfato 0.01 M, pH=8.2, conteniendo 0.9% NaCl y 0.1% gelatina. Se conserva 1-2 semanas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.
- Corticosterona tritiada con una actividad específica de 70-80 Ci/mmol
- Antisuero contra COR, obtenido de conejo, procedente de Bioclin (UK).
- Patrón: COR fría procedente de Sigma. De esta COR se preparó una solución original de 10 mg/ml en etanol absoluto (solución madre) y a continuación una de 10 ug/ml

(primera hija). Ambas se mantuvieron a 4 °C y son estables por 1 año y 1-2 meses respectivamente.

- Carbón activo.

Procedimiento

- **Curva patrón:** El día del análisis se preparó una solución de trabajo tomando 16 ul de la solución de 10 ug/ml y diluyéndola en 984 ul de tampón de RIA (se obtiene una solución standard (St 1) de una concentración de 1600 pg/10 ul). A partir de ésta, se prepararon diluciones a la mitad hasta una solución (St 7) de concentración de 25 pg/ul. En los tubos correspondientes a la curva patrón en el análisis, se colocó 10 ul de tampón (Bo= ceros, NSB= inespecíficos) o 10 ul de los patrones correspondientes.
- **Antisuero:** Se tomaron las alícuotas necesarias del antisuero y se disolvieron en el tampón del RIA en la proporción determinada por la valoración del antisuero (7.5 ml por alícuotas de 100 µl) y de la solución obtenida se colocó 100 ul en cada tubo de RIA (excepto a los NSB que en lugar de antisuero llevaron 100 ul de tampón).
- **Hormona marcada COR-³H:** Se preparó una solución de trabajo diluyendo la hormona marcada en el buffer fosfato para RIA. Esta dilución contenía siempre unas 8000 cpm/100 µl de tampón.
- **Muestras:** Plasma sin diluir para muestras control, para muestras de animales estresados se diluyó según el tiempo de estrés transcurrido.
- **Líquido de centelleo:** mezcla centelladora Optiphase “Hisafe” 3 (Perkin Elmer)

Los reactivos se añadieron a los tubos en el siguiente orden:

- 10 µl de patrón o tampón o muestra
- 200 µl de tampón y luego se agitó en un vortex.

- Se colocaron los tubos durante 30 min a 70 °C, para desproteínizar, en un baño y luego se enfriaron en hielo.
- Se colocó 100 µl de la hormona marcada
- Se agregó 100 µl del antisuero (excepto a los NSB).
- Se agitaron los tubos en un vortex y se incubó a 4 °C durante 18-24 h.

Tubos	Tampón	Standard ó Muestra	Agitar, y	COR-H ³	Antisuero	Agitar, y
NSB	210 ul	—	luego a	100 ul	—	luego
NSB	210 ul	—	70°C	“	—	4°C
B ₀	210 ul	—	30 min.	“	100 ul	18-24 hs.
B ₀	210 ul	—	enfriar	“	“	
St I	200 ul	10 ul		“	“	
Muestras	“	“		“	“	

Al día siguiente, se preparó una suspensión de carbón activado en tampón (1%), manteniendo la suspensión en agitación constante y a 4 °C durante 15 min. antes de añadirlo a los tubos (0.5 ml). Una vez añadido el carbón a los tubos, se agitaron y se centrifugaron (4000 rpm, 15 min, 4 °C). En esta fase los tubos permanecieron siempre a 4°C, con la gradilla en una cubeta con agua-hielo. Cuando se sacaron de la centrifuga inmediatamente se decantó el sobrenadante en los viales de centelleo. Esta fase se debe realizar lo más rápidamente posible, dado que se puede resuspender parcialmente el carbón. Una vez que los viales contenían el sobrenadante se añadió el líquido de centelleo. Se agitaron bien los viales y se determinó la radioactividad del sobrenadante en un contador β de centelleo líquido (Beckman ³H actividad 10⁵ dpm). Se confeccionó una curva en papel logit-log, graficando en el eje X las concentraciones de los estándares y en el eje Y el porcentaje de unión. El porcentaje de unión se calculó por la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de unión} = \frac{\text{cpm de la muestra o estándar} - \text{cpm de tubo NSB}}{\text{cpm del B}_0 - \text{cpm del tubo NSB}}$$

cpm: cuentas por min.

Para cada una de las muestras se calculó el porcentaje de unión y se extrapoló en la curva de manera de obtener la correspondiente concentración de COR.

Determinación de la glucemia

Protocolo:

Se realizó mediante el uso de un equipo enzimático comercial (Wiener). El fundamento del método colorimétrico utilizado en este equipo es que la glucosa de la muestra es oxidada a ácido glucónico por acción de la enzima glucosa oxidasa. El peróxido de hidrógeno producido, en presencia de la peroxidasa 4-aminofenazona y el fenol, forma una quinoneimina con un pico de absorción a 505 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de la glucosa de la muestra.

Cálculo de la glucemia

Glucosa (g/l) = Absorbancia de la muestra desconocida / Absorbancia del estándar

Obtención del índice adrenosomático

Se utiliza para obtener una cuantificación de la actividad crónica del eje HHA (Akana, S. y col., 1983, Lemaire, V. Y col., 1997), expresando los resultados como una relación del peso de ambas glándulas adrenales y el peso corporal del animal.

Extracción de las glándulas adrenales

Protocolo

Materiales

- Balanza

- Guillotina
- Material de cirugía

Procedimiento

- Se pesó el animal.
- Se lo decapitó.
- Se lo colocó en decúbito dorsal.
- Se realizaron sendas incisiones a lateral de la línea media.
- Se retiraron ambas glándulas adrenales.
- Se eliminó totalmente la grasa que las rodea.
- Se pesó las glándulas.

Cálculo del índice adrenosomático (IAS)

$$\text{IAS} = [\text{Peso de las glándulas adrenales (g)} / \text{Peso del animal (g)}] \times 1000$$

Determinación de la relación corteza/médula adrenal y obtención de imágenes de la corteza adrenal.

Protocolo

Materiales y reactivos

- Formol bufferado al 10 %.
- Microscopio Zeiss asociado a un VIDAS-KONTRON.
- Micrótopo de deslizamiento
- Estufa de parafina
- Alcoholes de graduación creciente
- Hematoxilina
- Eosina

Procedimiento

- Se extrajeron las glándulas adrenales como se explicó anteriormente.
- Se las colocó en un frasco con formol bufferado al 10 % durante 8 a 10 horas.
- Se deshidrató el tejido en alcoholes crecientes.
- Se lo aclaró.
- Se lo incluyó en estufa de parafina a 57 °C.
- Se lo cortó en láminas de 4 μm .
- Se lo coloreó con Hematoxilina-Eosina.
- Se determinó la relación corteza-médula y se obtuvieron las imágenes de la corteza adrenal mediante el uso de un microscopio Zeiss asociado a un programa VIDAS-KONTRON.

b- Cultivos de linfocitos de bazo estimulados con Con-A.

Preparación de suspensiones de células de bazo de rata

Protocolo

Material y reactivos

- Medio de cultivo RPMI 1640 –10 completo (Sigma), que contiene:

10 % de suero fetal bovino inactivado por calor 1 h a 56 °C

50 μM 2-ME

2 mM L-glutamina

100 U/ml penicilina

100 $\mu\text{g/ml}$ sulfato de estreptomicina

- 2-mercaptoetanol (2-ME), el cual debe ser agregado al medio inmediatamente antes de su uso porque su actividad declina rápidamente cuando está diluido. El 2-ME concentrado se diluyó a una concentración 50 mM en RPMI 1640 y esta solución se

agregó al medio a una concentración final de 50 μ M. La solución stock 50 mM se guardó refrigerada a 4°C hasta 4 meses.

- Centrífuga con rotor Sorvall H-1000B
- Pipetas Pasteur
- Material de cirugía
- Pipetas automáticas con tips descartables
- Cápsulas de petri de 60 x 15 mm
- Policubeta de 96 pocillos
- Malla de acero inoxidable con poros de 200 μ m de diámetro
- Jeringa descartable de 5 ml
- Campana de flujo laminar

Procedimiento

- Se sacrificaron las ratas por decapitación.
- Inmediatamente, en un ambiente estéril, bajo campana, se la humedeció completamente con alcohol etílico al 70 %.
- Se la colocó en decúbito lateral derecho y se le sacó la piel del flanco izquierdo.
- Se llevó el animal a la campana de flujo laminar.
- Se realizó una incisión de 1,5 cm en el flanco izquierdo.
- Se extrajo el bazo y se lo limpió totalmente de los tejidos que lo rodeaban.
- Se colocó el bazo sobre una malla de acero inoxidable con poros de 200 μ m, dentro de una cápsula de petri de 60 x 15 mm, la cual contenía 5 ml de RPMI 1640-10 completo con rojo fenol.
- Se comprimió el órgano con el émbolo de una jeringa contra la malla de acero inoxidable, realizando movimientos de rotación, lavando finalmente la misma con otros 5 ml del mismo medio.
- Se colocó la suspensión de células mononucleares en un tubo cónico de 15 ml.
- Se centrifugó 10 min a 1500 rpm.
- Se eliminó el sobrenadante.

- Se resuspendieron las células del pellet con 5 ml de RPMI 1640-10 completo con rojo fenol.
- Si hubo contaminación con glóbulos rojos se procedió a lisarlos previo a la resuspensión en RPMI 1640-10 completo con rojo fenol.
- Se determinó la viabilidad celular mediante el test de exclusión con azul Tripán (gota a gota)
- Se contaron las células en cámara de Neubauer.
- Se ajustó la concentración celular a 1×10^6 células / ml de RPMI 1640-10 completo con rojo fenol.

Lisis de glóbulos rojos

Protocolo

- Se colocaron 500 microlitros de agua helada en el tubo cónico conteniendo el pellet de células mononucleares obtenidas de bazo de rata como se explicó anteriormente. Se dejó actuar 5 segundos.
- Se llevó a 10 ml con RPMI 1640 completo.
- Se centrifugó.
- Se lavó con RPMI 1640 completo.

Test de viabilidad celular por exclusión con azul tripán

Protocolo

Materiales y reactivos

- Suspensión celular obtenida en el punto 13 de la técnica de preparación de suspensiones de células de bazo de rata.
- Azul tripán al 0,4 % (GIBCO/BRL # 630-5250AG).

- Cámara de Neubauer.

Procedimiento

- Se realizó mezclando una parte de azul tripán al 0,4 % con una parte de la suspensión celular obtenida en el punto 13 de la técnica de cultivo de linfocitos de bazo citada arriba.
- Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos, luego de lo cual fueron contadas en una cámara de Neubauer las células viables (no coloreadas) y las no viables (coloreadas) hasta alcanzar un total de 100 células.

Cálculo el porcentaje de células viables

$$\text{Células viables (\%)} = \frac{\text{Número total de células viables/ml de alícuota}}{\text{Número total de células/ml de alícuota}} \times 100$$

Cultivo de linfocitos de bazo

Protocolo

Material y reactivos

- Células respondedoras: linfocitos de bazo de ratas no inmunizadas
- Medio de cultivo RPMI 1640 –10 completo (Sigma)
- (2-ME), 50 μ M.
- Concanavalina-A 2,5 μ g/ml
- Pipetas Pasteur
- Pipetas automáticas con puntas descartables
- Policubeta de 96 pocillos
- Campana de flujo laminar

- Estufa de cultivo

Procedimiento

- Se realizó el cultivo de los linfocitos de bazo de rata en policubetas de 96 pocillos, colocando 200.000 células / pocillo (200 µl de la suspensión de 1×10^6 células /ml) por triplicado, sin estimulación y estimuladas con Concanavalina-A (Con-A) en una concentración de 2,5 µg/ml. (*)
- Se cultivó la policubeta con humedad a 37 °C, 5% de CO₂ durante 72 h.

Determinación de la captación de ³H timidina por las células de los cultivos de bazo

Protocolo

Material y reactivos

- [³H] metiltimidina (6.7 Ci/mmol, #NET-027, Biomedicals)
- RPMI sin suero fetal bovino
- Células de 72 h de cultivo
- Micropipetas con tips descartables
- Cosechador de células semiautomático
- Papel de fibra de vidrio
- Viales
- Mezcla centelladora comercial HiSafe 3 (Perkin Elmer)
- Contador β de centelleo líquido (Beckman)

Procedimiento

- Luego de 48 h de cultivo de las células como se explica en (*), se agregó 1 µCi de [³H] timidina a cada pocillo, retornando la policubeta a la estufa de cultivo durante 24 hs.

- Se cosecharon las células con un cosechador semiautomático, el cual lisa las células con agua y precipita el DNA sobre un papel de fibra de vidrio.
- Los círculos de papel de fibra de vidrio conteniendo el DNA marcado con [³H] timidina correspondientes a cada pocillo, fueron colocados en sendos viales a los que se les agregó 1 ml de mezcla centelladora, agitándola y dejándola reposar 24 hs.
- Se midió la radioactividad en cpm en un contador β de centelleo líquido.

Se expresaron los datos como **un índice de estimulación (IE)**

IE (cpm) = cpm de los cultivos estimulados con Con-A - cpm de los cultivos no estimulados.

Cada dato surge de la media aritmética de cpm de los tres cultivos estimulados y de los tres no estimulados correspondientes.

Curva de calibración con Con-A

Protocolo

Materiales y reactivos

- Células respondedoras: linfocitos de bazo de ratas no inmunizadas
- Medio de cultivo RPMI 1640 –10 completo (Sigma)
- (2-ME), 50 μM
- Concanavalina-A
- [³H] timidina
- Pipetas Pasteur
- Pipetas automáticas con puntas descartables
- Policubeta de 96 pocillos
- Campana de flujo laminar
- Estufa de cultivo

- Cosechador de células semiautomático
- Papel de fibra de vidrio
- Viales
- Mezcla centelladora comercial HiSafe 3 (Perkin Elmer)
- Contador β de centelleo líquido (Beckman)

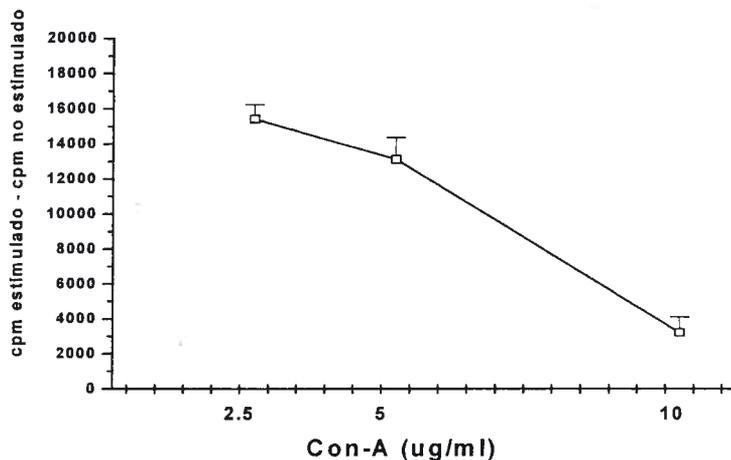
Procedimiento

- Se realizó una dilución 1:10 de la solución de Con-A que contiene 5mg/ml.
- Se dividió esta solución en alícuotas y congelar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su uso.
- Se hicieron por triplicado cada una de 3 diluciones de Con-A (2,5, 5 y 10 $\mu\text{g/ml}$), colocando en el pocillo 1, 2 y 4 μl de una dilución 1:10 de la sol madre de 5 mg/ml, respectivamente. Además se cultivaron por triplicado células con RPMI, sin Con-A y un blanco, por triplicado sin células ni Con-A.
- Se colocaron 200.000 cél / pocillo (200 μl de la suspensión de $1 \times 10^6/\text{ml}$) en cada pocillo con la lectina y también a los pocillos control, excepto en los tres últimos, que no llevan células. (Blanco).
- Se cultivó la policubeta con humedad, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5% de CO_2 durante 72 hs.
- Luego de 48 h de cultivo, se agregó 1 μCi de [^3H] timidina a cada pocillo, retornando la policubeta a la estufa de cultivo durante 24 hs.
- Se cosecharon las células con un cosechador de semiautomático.
- Los círculos de papel de fibra de vidrio conteniendo el DNA marcado con [^3H] timidina correspondientes a cada pocillo, fueron colocados en sendos viales a los que se les agregó 1 ml de mezcla centelladora, agitándola y dejándola reposar 24 hs.
- Se midió la radioactividad en cpm en un contador β de centelleo líquido.

Se expresaron los datos como **un índice de estimulación (IE)**

IE (cpm) = cpm de los cultivos estimulados - cpm de los cultivos no estimulados

- Se graficaron los resultados obtenidos.



Proliferación de linfocitos en cultivos estimulados con Con-A. Los resultados se expresan como las medias \pm S. E. M.. Cada dato surge de la media aritmética de las cpm de los tres cultivos estimulados con una determinada concentración de Con-A a los que se le restan los tres no estimulados correspondientes.

Teniendo en cuenta el gráfico anterior se seleccionó la concentración de 2,5 μ g / ml de Con-A para estimular los cultivos.

c- El índice esplenosomático y el número de células mononucleares del bazo / g de órgano.

Extracción del bazo

Protocolo

Se usó el protocolo del primer experimento.

Cálculo del índice esplenosomático (IES)

$$\text{IES} = [\text{Peso del bazo (g)} / \text{Peso del animal (g)}] \times 1000$$

Número de células mononucleares / gr de bazo

Protocolo

Material y reactivos

- Placa de Petri
- Solución de Hank's
- Pipetas
- Malla de acero inoxidable con poros de 200 nm de diámetro
- Centrífuga
- Cámara de Neubauer

Procedimiento

- Se colocó el bazo en una placa de Petri con 5 ml solución de Hank's.
- Se lo comprimió a través de una malla de acero inoxidable con poros de 200 nm de diámetro.
- Se agregaron 5 ml de la solución de Hank's.
- Se centrifugó a 1500 rpm / min.
- Se eliminó el sobrenadante.
- Se resuspendió el culot de células en 5 ml de sol de Hank's.
- Con esta suspensión se realizó el recuento de células en una cámara de Neubauer.

Calculo del número de células mononucleares / gr de bazo

$$(\text{N}^\circ \text{ de células / ml}) \times 5 \text{ ml de suspensión} = \text{N}^\circ \text{ de células en 5 ml}$$

Nº de células en 5 ml / peso del bazo (g) = Nº de células / g de bazo

Segundo experimento

Determinación del número total de glóbulos blancos y de los subtipos de leucocitos, correlacionado con la concentración de COR en sangre periférica.

Protocolo

- Se extrajo sangre mediante una pequeña incisión en uno de los vasos sanguíneos de la cola de la rata.
- Con una gota de sangre se realizó un extendido.
- Con el resto se colocaron con una pipeta automática 50 µl en un tubo conteniendo 1 ml de solución de Turk (obteniéndose una dilución 1:200).
- Se realizó el recuento de glóbulos blancos en una cámara de Neubauer.

A fin de determinar la fórmula leucocitaria relativa se coloreó el extendido mediante la coloración de May Grünwald-Giemsa, para luego realizar un recuento de 200 células blancas.

Tercer experimento

Efecto del bloqueo de los receptores adrenérgicos β sobre de la cantidad de glóbulos blancos y los subtipos de leucocitos en la sangre periférica.

Protocolo

Este experimento se realizó en los cuatro grupos de animales siguiendo el diseño experimental expresado anteriormente y se utilizó el protocolo descrito en el experimento 2.

RESULTADOS

Primer experimento

Este experimento se realizó para investigar el efecto de un estrés prenatal físico, crónico, imprevisible e inescapable, en las crías macho adultas, sobre parámetros neuroendócrinos, la funcionalidad de los linfocitos del bazo y el tamaño de este órgano luego de una exposición aguda al mismo estrés.

Para demostrar los efectos del estrés prenatal sobre la función neuroendócrina de la cría, se determinaron los niveles plasmáticos de corticosterona y glucemia y se obtuvieron los índices adrenosomáticos, la relación corteza-médula adrenal y las imágenes de la corteza adrenal.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA EN CONDICIONES BASALES Y LUEGO DE UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL.

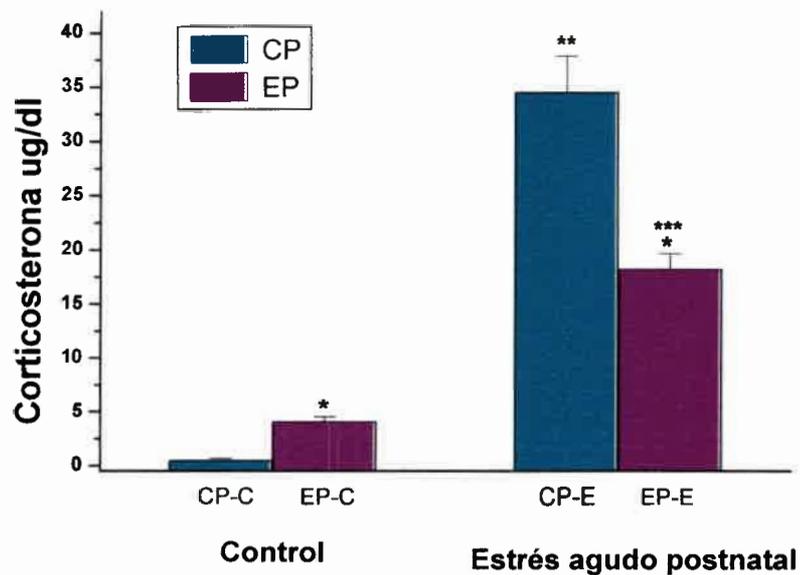


FIG. 4. Niveles de la corticosterona plasmática (ug/dl) en las crías macho adultas EP y CP en condiciones basales EP-C ($n = 9$) CP-C ($n = 7$) y luego de la exposición al estrés agudo postnatal EP-E ($n = 13$) y CP-E ($n = 7$).

Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0,05$ entre EP-C y CP-C; EP-E y CP-E. ** $p < 0,05$ -entre CP-E y CP-C. *** $p < 0,05$ entre EP-E y EP-C.

Se usó un ANOVA de dos vías: tratamiento de la madre (Estrés prenatal) y tratamiento de la cría (Estrés agudo). Como test "*a posteriori*" se usó un test de Duncan.

La corticosterona plasmática mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F_{1,32} = 40,32$ p <0000001) y postnatal ($F_{1,32} = 559,67$ p <0000001). Se encontró interacción entre ambos factores ($F_{1,32} = 133.31$ p <0000001).

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE EL ÍNDICE ADRENOSOMÁTICO

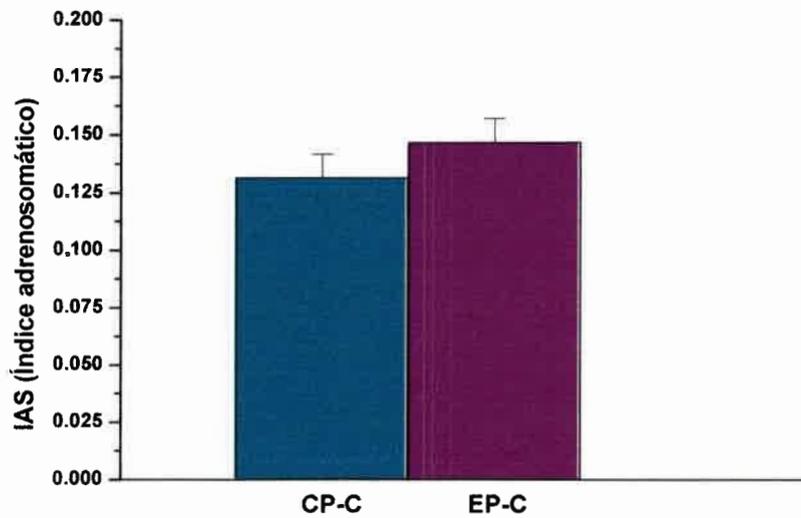


FIG. 5. Índice adrenosomático en las crías macho adultas EP y CP en condiciones basales EP-C ($n = 4$), CP-C ($n = 4$). Cada barra representa la media \pm S. E. M. n. s.

El análisis estadístico (ANOVA de una vía) no mostró efecto significativo del tratamiento prenatal ($F_{1,15} = 0,026$ $p = 0,87$).

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA RELACIÓN CORTEZA:MÉDULA ADRENAL

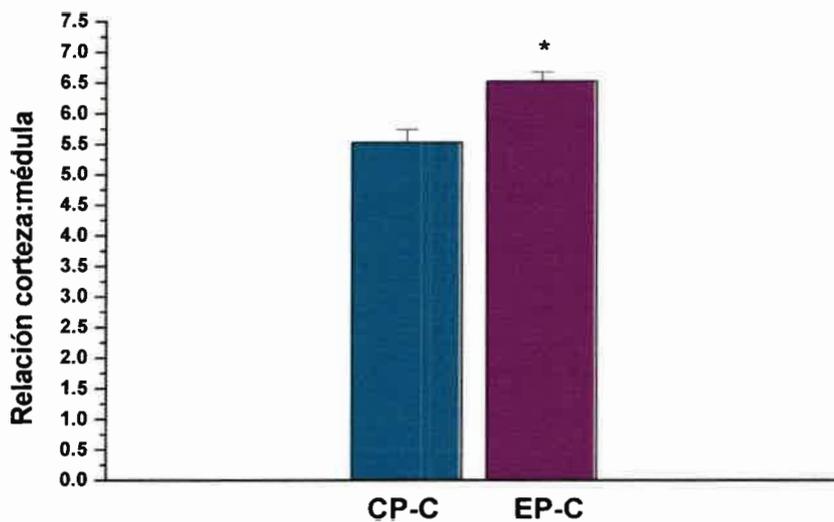


FIG. 6. *Relación corteza:médula adrenal en las crías macho adultas en condiciones basales EP-C (n = 10) y CP-C (n = 9). Cada barra representa la media ± S. E. M. * p < 0,05*

La relación corteza:médula mostró mediante el análisis estadístico (ANOVA de una vía) un efecto significativo del tratamiento de la madre (estrés prenatal) ($F_{1,17} = 17,67$ $p = 0,00059$)

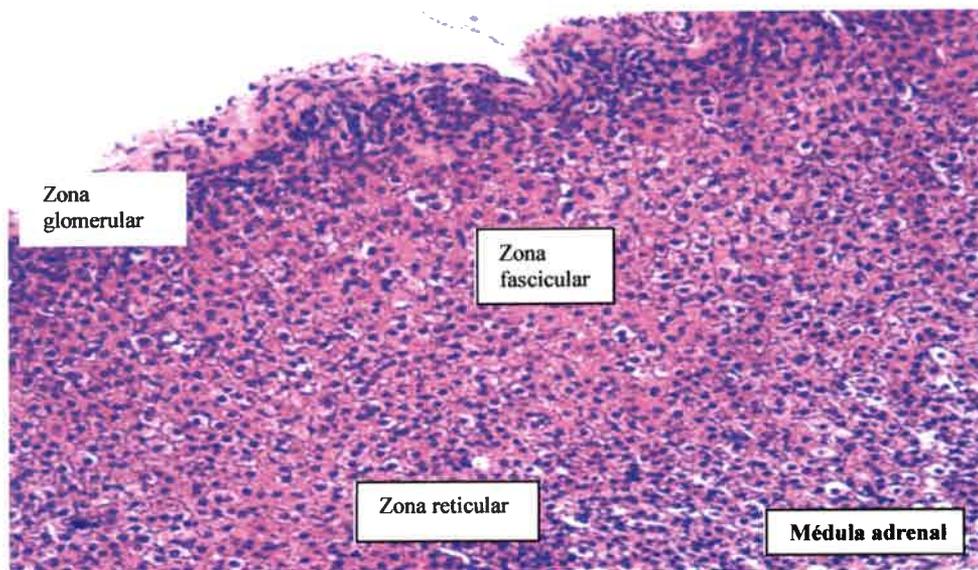


FIG. 7. Microfotografía de la corteza adrenal de un animal del grupo CP-C (200 x).

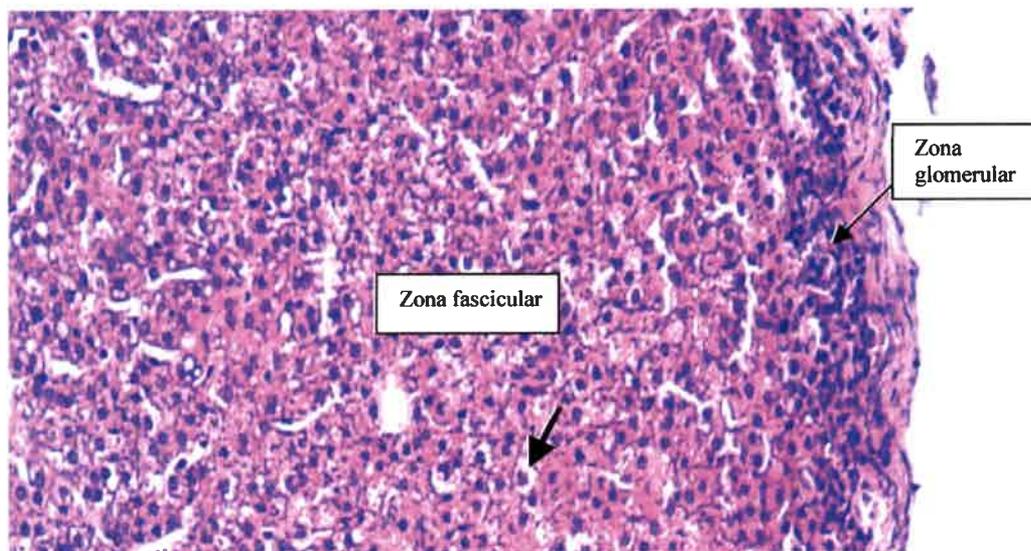


FIG. 8. Microfotografía de la corteza adrenal de un animal del grupo EP-C (400 x).

La flecha ← indica una zona de menor afinidad tintorial en la región fascicular de la glándula adrenal.

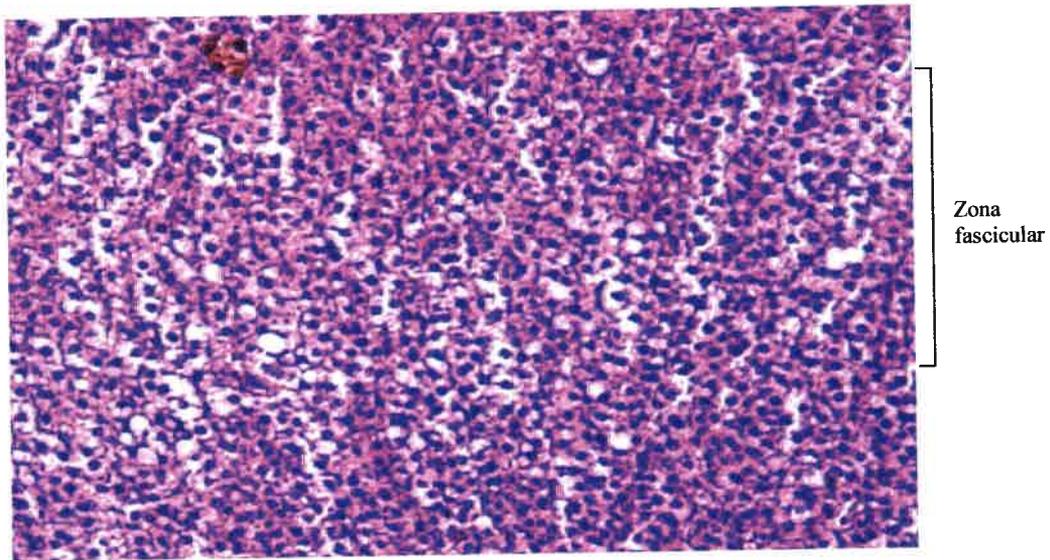


FIG. 9. *Microfotografía de la corteza adrenal de un animal del grupo CP-E (400 x).*

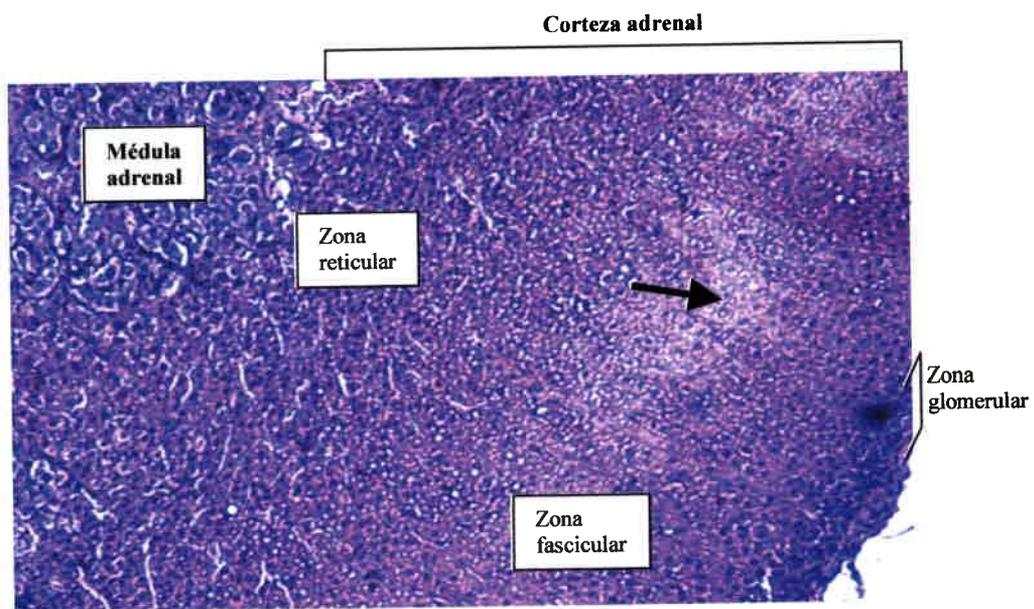


FIG. 10. *Microfotografía de la corteza adrenal de un animal del grupo EP-E (200 x).*

La flecha → indica una zona de menor afinidad tintorial en la región fascicular de la glándula adrenal.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA GLUCEMIA, EN CONDICIONES BASALES Y LUEGO DE UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL.

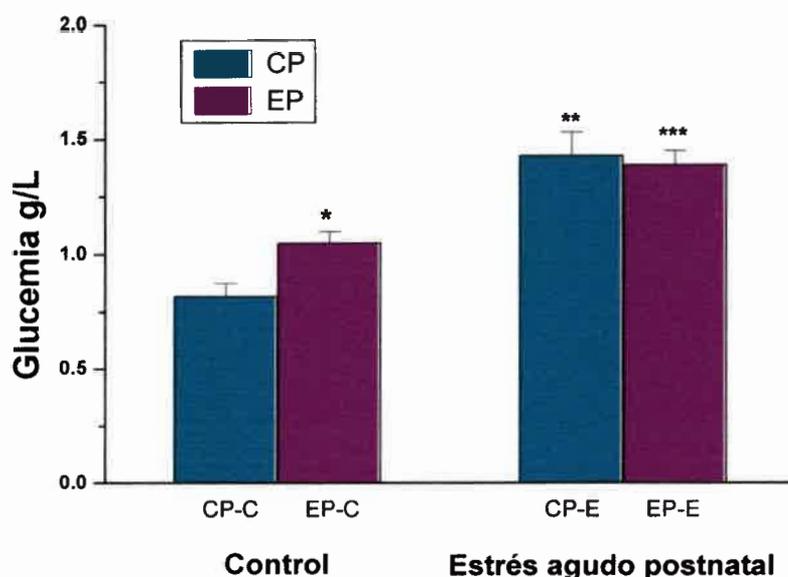


FIG. 11. Glucemia (g/l) en las crías macho adultas EP y CP en condiciones basales EP-C (n=12), CP-C (n = 7) y luego de la exposición al estrés agudo postnatal EP-E(n=12), CP-E (n = 6). Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0,02$ entre EP-C y CP-C. ** $p < 0,00005$ entre CP-E y CP-C. * $p < 0,001$ entre EP-E y EP-C.**

El análisis estadístico (ANOVA de dos vías) de los efectos del estrés prenatal sobre la glucemia en las crías adultas muestra efecto significativo del tratamiento postnatal ($F_{1,33} = 50,168$ $p < 0,0000001$). La interacción fue significativa entre ambos factores ($F_{1,33} = 4,17$, $p = 0,049$). El test “*a posteriori*” mostró que el estrés prenatal provocó un aumento significativo de los niveles basales de la glucosa plasmática ($p < 0,02$) y que esa diferencia se pierde luego del estrés postnatal. ($p = 0,66$)

La correlación entre la glucemia (g/l) y los niveles de COR plasmática (ug/dl) es positiva: $r = 0,7559$ $p < 0,0001$.

Para demostrar el efecto del estrés prenatal sobre la funcionalidad de los linfocitos, se realizaron los cultivos de los linfocitos del bazo estimulados con Concanavalina-A.

EFFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS T, EN CONDICIONES BASALES Y LUEGO DE UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL.

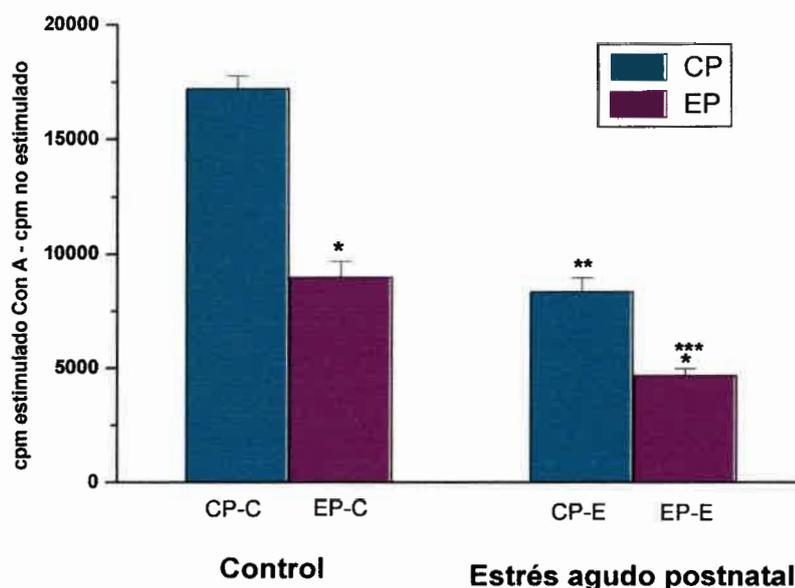


FIG. 12. Proliferación de los linfocitos T del bazo (cpm) en respuesta a Con-A (2,5 ug/ml) en las crías macho adultas EP y CP en condiciones basales EP-C (n=8), CP-C (n = 7) y luego de la exposición al estrés agudo postnatal EP-E (n=6), CP-E (n = 9). Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0,0001$ entre EP-C y CP-C. ** $p < 0,00006$ entre CP-E y CP-C. * $p < 0,00006$ entre EP-E y EP-C.**

Se usó un ANOVA de dos vías: tratamiento de la madre (Estrés prenatal) y tratamiento de la cría (Estrés agudo). Como test "a posteriori" se usó un test de Duncan.

La proliferación de los linfocitos del bazo mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F_{1,26} = 133,34$ $p < 0,0000001$) y postnatal ($F_{1,26} = 163,76$ $p < 0,0000001$). La interacción entre ambos factores fue significativa ($F_{1,26} = 19,65$ $p = 0,00015$).

La correlación entre la proliferación de los linfocitos T del bazo (cpm) y los niveles de COR plasmática fue negativa: $r = -0,5123$ $p = 0,006$.

Para comprobar el efecto del estrés prenatal sobre el tamaño del bazo se determinó el índice esplenosomático y el número de células mononucleares del bazo/peso de bazo.

EFFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE EL ÍNDICE ESPLENOSOMÁTICO, EN CONDICIONES BASALES Y LUEGO DE UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL.

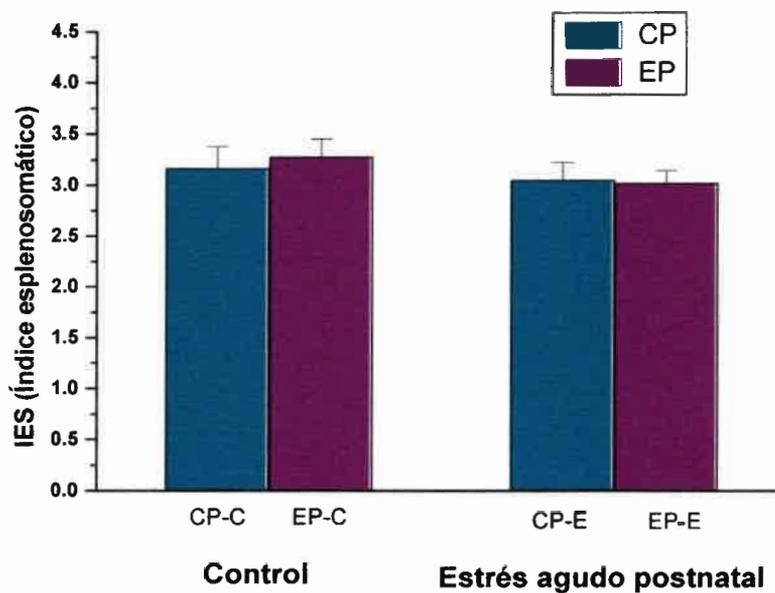


FIG.13. Índice esplenosomático en las crías macho adultas EP y CP en condiciones basales EP-C y CP-C ($n = 5$) y luego de la exposición al estrés agudo postnatal EP-E y CP-E ($n = 5$). Cada barra representa la media \pm S. E. M. n. s.

Se usó un ANOVA de dos vías: tratamiento de la madre (Estrés prenatal) y tratamiento de la cría (Estrés agudo).

El índice esplenosomático no mostró efecto significativo del tratamiento prenatal ($F_{1,16} = 1,53$ $p = 0,23$) ni del estrés postnatal ($F_{1,16} = 0,04$ $p = 0,84$).

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE EL NÚMERO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DEL BAZO/PESO DEL ÓRGANO.

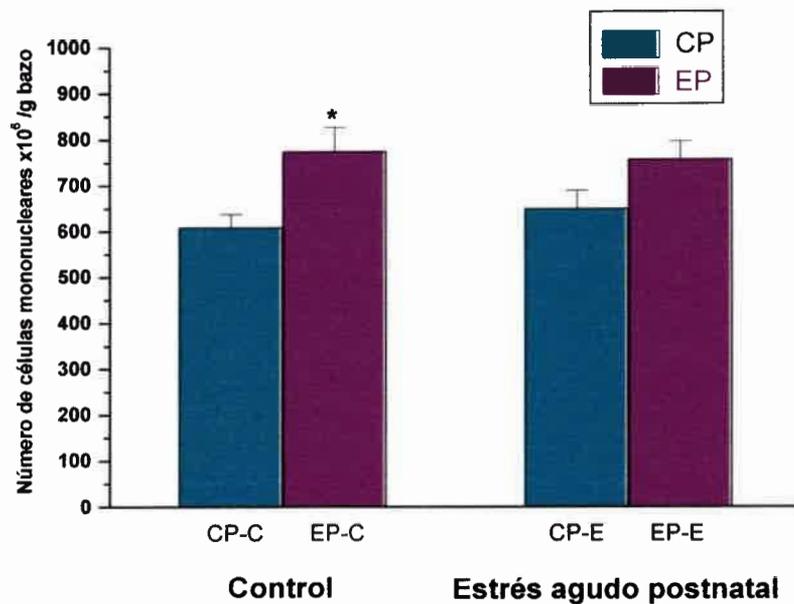


FIG. 14. Número de células mononucleares/gr de bazo en las crías adultas EP y CP en condiciones basales EP-C ($n = 5$), CP-C ($n = 4$) y luego de la exposición al estrés agudo postnatal EP-E y CP-E ($n = 4$). Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0,05$.

Se usó un ANOVA de dos vías: tratamiento de la madre (Estrés prenatal) y tratamiento de la cría (Estrés agudo). Como test “*a posteriori*” se usó un test de Duncan.

El número de células mononucleares del bazo mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F_{1,13} = 10,24$ $p = 0,0069$) y no hubo diferencias significativas luego de la exposición al estrés agudo postnatal ($F_{1,13} = 0,06$ $p = 0,81$).

Del análisis de los resultados de este experimento podemos concluir que los niveles basales de la corticosterona plasmática son mayores en los animales estresados prenatalmente que en sus controles. Luego de la exposición al mismo estrés postnatal, los niveles de la hormona aumentan en ambos grupos, aunque ese aumento es estadísticamente inferior en los animales estresados prenatalmente (Fig. 4). Esta respuesta es producida por una glándula adrenal que muestra un aumento significativo de la relación corteza : médula (Fig. 6), el cual no se acompaña de una modificación del tamaño total de la glándula (Fig. 5). La zona fascicular de la corteza aparentemente estaría más activa en los animales EP (Fig.7, 8, 9, 10).

Los niveles basales de la glucosa sanguínea son significativamente mayores en los animales estresados prenatalmente. Esa diferencia desaparece luego de aplicado el estrés agudo postnatal debido a un menor aumento de la glucemia en este grupo de animales (24 %) con respecto al grupo control (43 %) (Fig. 11). Además se obtuvo una correlación positiva entre la glucemia y los niveles de la corticosterona plasmática.

Con respecto a los parámetros inmunes, se observa una menor proliferación basal de los linfocitos T esplénicos en los animales estresados prenatalmente que en sus controles. La exposición al estrés agudo postnatal reduce significativamente la respuesta proliferativa en ambos grupos (Fig. 12). La correlación entre la proliferación de los linfocitos T del bazo y los niveles de la corticosterona plasmática es negativa. Por otro lado, el tamaño del bazo no sufre modificación por el estrés prenatal ni postnatal (Fig. 13), aunque el número de células mononucleares del órgano es mayor en los animales sometidos al estrés prenatal (Fig. 14).

Segundo experimento

Este experimento se realizó para investigar el efecto de un estrés prenatal físico, crónico, imprevisible e inescapable, en las crías macho adultas, sobre parámetros inmunológicos y la influencia del eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal ejercida sobre los mismos, luego de una exposición aguda al mismo estrés.

Para demostrar el efecto del estrés prenatal sobre la distribución de los leucocitos, se realizó la determinación de la cantidad de glóbulos blancos y el porcentaje de los subtipos de leucocitos, correlacionados con la concentración de la corticosterona en la sangre periférica.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LOS CAMBIOS EN LOS NIVELES DE CORTICOSTERONA PLASMÁTICA LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL

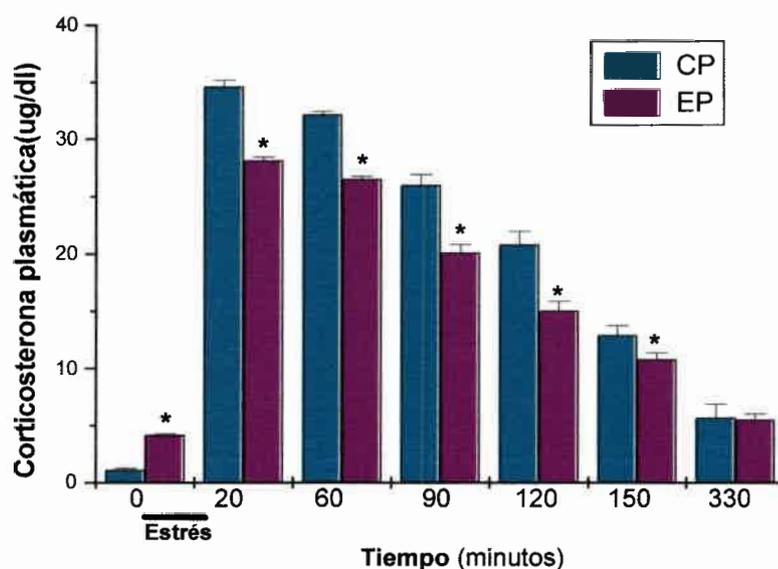


FIG. 15. Niveles de la corticosterona plasmática en las crías macho adultas EP ($n = 5$) y CP ($n = 5$), luego de la exposición al estrés agudo postnatal a lo largo de 310 minutos. Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0,05$

Cuando se estudiaron los efectos del estrés prenatal sobre el perfil de la corticosterona plasmática para el grupo EP y el grupo CP, el análisis estadístico MANOVA de medidas repetidas de dos vías mostró los efectos del tratamiento estrés prenatal ($F_{1,8} = 525,61$ $p < 0,0000001$) y del tiempo ($F_{6,48} = 472,09$ $p < 0,0000001$). La interacción fue

significativa entre ambos factores ($F_{6,48} = 12,54$ $p < 0,0000001$). Como test "*a posteriori*" se usó un test de Duncan el cual mostró que los niveles basales de la COR plasmática en los animales EP ($4,18 \pm 0,12$ $\mu\text{g/dl}$) fueron significativamente mayores que los niveles basales en los animales CP ($1,10 \pm 0,15$ $\mu\text{g/dl}$), $p = 0,0047$.

Ambos grupos de animales mostraron una elevación significativa de los niveles de la COR plasmática con respecto a los niveles basales, inmediatamente después de aplicado el IMO agudo, pero los valores obtenidos fueron significativamente menores que los de sus controles prenatales en el mismo tiempo ($p < 0,05$). A los 330 minutos los niveles plasmáticos de la COR de los animales EP se igualaron a los de los animales CP ($p = 0,878$).

EFFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE EL NÚMERO DE GLÓBULOS BLANCOS LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL

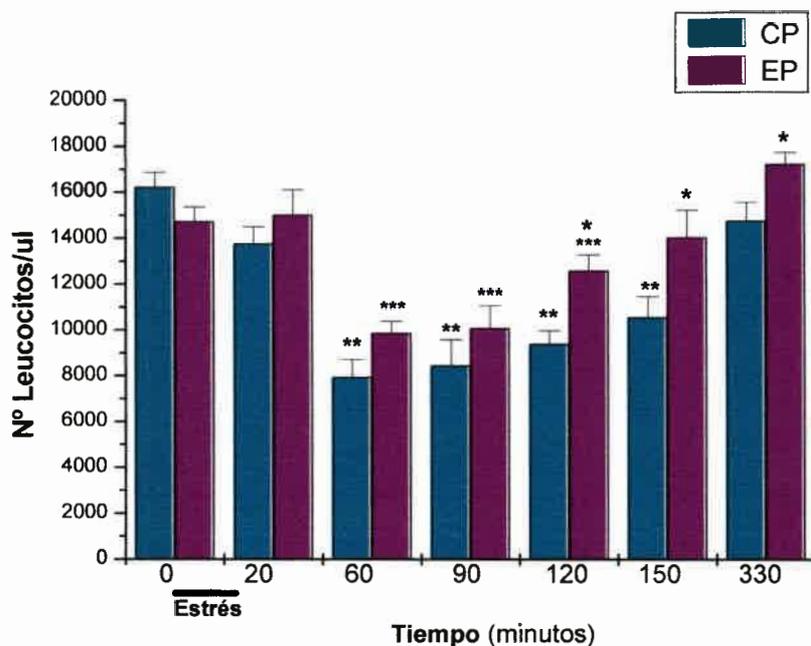


FIG.16. *Perfiles cinéticos del número de leucocitos en la sangre periférica de las crías macho adultas EP (n = 10) y CP (n = 8) luego de la exposición al estrés agudo postnatal a lo largo de 310 minutos. Cada barra representa la media ± S. E. M. * p < 0,05 entre EP-E y CP-E. ** p < 0,05 entre CP-E y CP-C. *** p < 0,05 entre EP-E y EP-C.*

El análisis estadístico MANOVA de medidas repetidas de dos vías mostró los efectos del tratamiento estrés prenatal ($F_{1,16} = 8,33$ $p = 0,011$) y tiempos ($F_{6,96} = 29,32$ $p = 0,0000001$). La interacción entre ambos factores fue significativa ($F_{6,96} = 2,38$ $p = 0,035$). A partir de los 60 minutos se observa una disminución significativa del número de leucocitos en la sangre periférica, tanto en los animales EP como CP con respecto a sus valores basales, lo que continúa hasta los 150 minutos. A los 330 minutos los resultados se igualan a los valores basales correspondientes. El número de leucocitos es mayor en los animales EP-E que en sus respectivos controles CP-E en los tiempos 120, 150 y 330 minutos.

EFFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE EL PORCENTAJE DE LINFOCITOS LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL

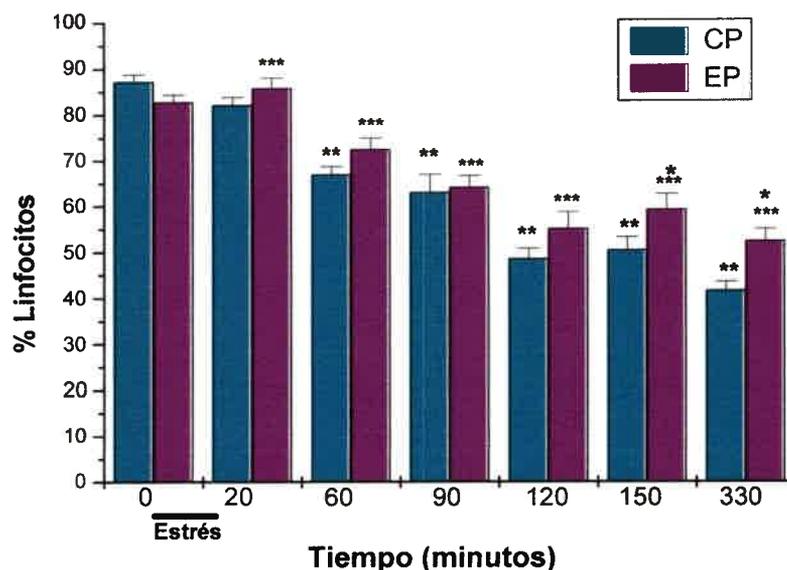


FIG. 17. Los perfiles cinéticos del porcentaje de linfocitos en la sangre periférica de las crías macho adultas EP (n = 13) y CP (n = 12), luego de la exposición al estrés agudo postnatal a lo largo de 310 minutos. Cada barra representa la media \pm S. E. M. * p < 0,05 entre EP-E y CP-E. ** p < 0,05 entre CP-E y CP-C. *** p < 0,05 entre EP-E y EP-C.

Cuando se analizaron los efectos del estrés prenatal sobre los perfiles cinéticos del porcentaje de linfocitos en la sangre periférica para el grupo EP y el grupo CP, el análisis estadístico MANOVA de medidas repetidas de dos vías: tratamiento (estrés prenatal) y tiempo, mostró efecto del tratamiento estrés prenatal ($F_{1,23} = 6,11$ p = 0,021) y de los tiempos ($F_{6,138} = 86,81$ p < 0,0000001). La interacción entre ambos factores fue significativa ($F_{6,138} = 2,45$ p = 0,027).

A partir de los 60 minutos se observa una disminución significativa del porcentaje de linfocitos tanto en los animales EP como CP con respecto a sus valores basales, lo cual continúa hasta los 330 minutos. El porcentaje de linfocitos es mayor en los animales EP-E que en sus respectivos controles CP-E en los tiempos 150 y 330 minutos.

EFFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE EL PORCENTAJE DE NEUTRÓFILOS LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL

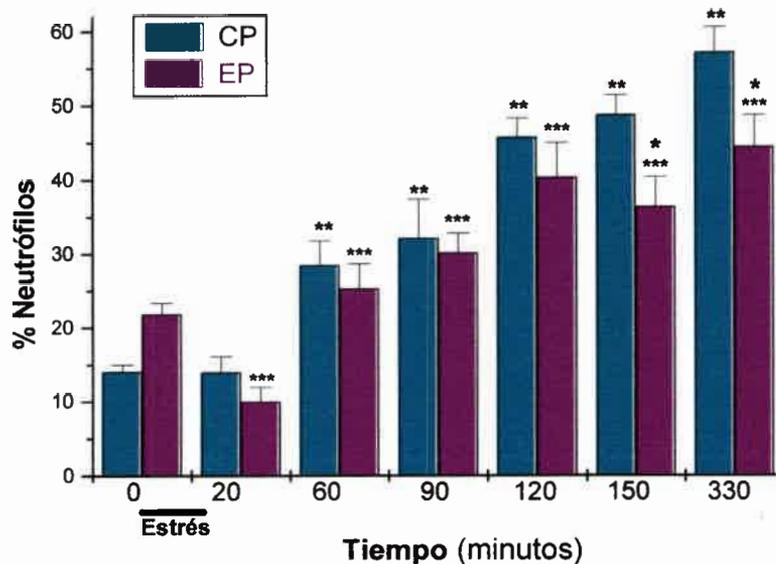


FIG. 18. *Los perfiles cinéticos del porcentaje de neutrófilos en la sangre periférica de las crías macho adultas EP (n = 10) y CP (n = 9), luego de la exposición al estrés agudo postnatal a lo largo de 310 minutos. La barra representa la media ± S. E. M. * p < 0,05 entre EP-E y CP-E. ** p < 0,05 entre CP-E y CP-C. *** p < 0,05 entre EP-E y EP-C.*

los efectos del estrés prenatal sobre los perfiles cinéticos del porcentaje de los neutrófilos en la sangre periférica para el grupo EP y el grupo CP, el análisis estadístico MANOVA de medidas repetidas de dos vías: tratamiento (estrés prenatal) y tiempo, mostró los efectos del tratamiento estrés prenatal ($F_{1,17} = 5,59$ $p = 0,03$) y del tiempo ($F_{6,102} = 39,15$ $p < 0,0000001$). La interacción entre ambos factores fue significativa, ($F_{6,102} = 2,35$ $p = 0,036$). Luego del estrés agudo los animales EP muestran un descenso del porcentaje de neutrófilos con respecto a los valores basales. A partir de los 60 minutos se observa un aumento significativo del porcentaje de neutrófilos tanto en los animales EP como CP con respecto a sus valores basales, el que continúa hasta los 330 minutos. El porcentaje de neutrófilos es menor en los animales EP-E que en sus respectivos controles CP-E en los tiempos 150 y 330 minutos.

EFFECTOS DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA RELACIÓN NEUTRÓFILO- LINFOCITO LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL

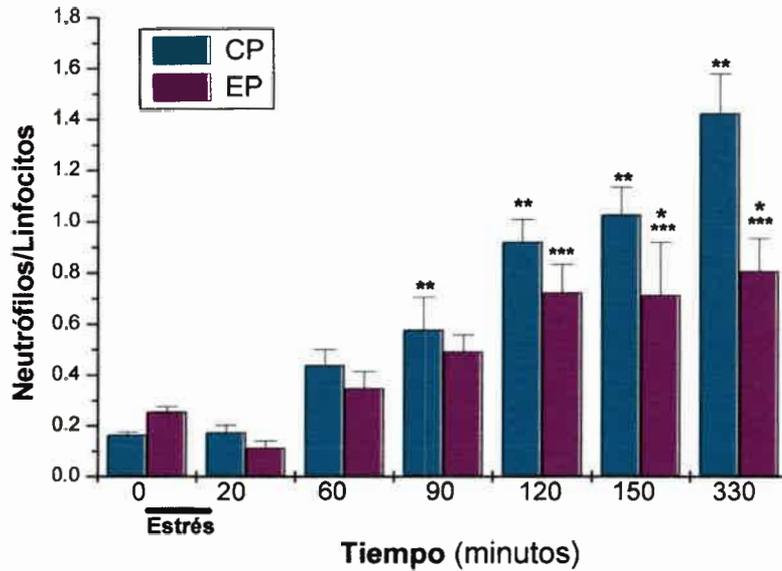


FIG. 19. *Perfiles cinéticos de la relación neutrófilos/linfocitos en la sangre periférica de las crías macho adultas EP (n = 8) y CP (n = 9), luego de la exposición al estrés agudo postnatal a lo largo de 310 minutos. La barra representa la media ± S. E. M. * p < 0,05 entre EP-E y CP-E. ** p < 0,05 entre CP-E y CP-C. *** p < 0,05 entre EP-E y EP-C.*

El análisis estadístico MANOVA de medidas repetidas de dos vías: tratamiento (estrés prenatal) y tiempo mostró los efectos del tratamiento estrés prenatal ($F_{1,15} = 7,92$ $p = 0,013$) y del tiempo ($F_{6,90} = 28,03$ $p = 0,0000001$) La interacción entre ambos factores fue significativa. ($F_{6,90} = 2,79$ $p = 0,016$). A partir de los 90 minutos se observa un aumento significativo de la relación neutrófilos / linfocitos en los animales CP, el cual continúa hasta los 330 minutos. Los animales EP muestran un aumento significativo de la relación neutrófilos / linfocitos a los 120 minutos, el cual continúa hasta los 330 minutos. La relación neutrófilos / linfocitos es menor en los animales EP-E que en sus respectivos controles CP-E en los tiempos 150 y 330 minutos.

Del análisis de los resultados de este experimento podemos concluir que los niveles basales de la corticosterona plasmática en los animales estresados prenatalmente son significativamente mayores que los de sus controles. Ambos grupos de animales muestran una elevación significativa de los niveles de la hormona con respecto a sus valores basales, inmediatamente después de aplicado el estrés agudo postnatal. Sin embargo, los niveles obtenidos son significativamente menores en los animales estresados prenatalmente, en cada tiempo, hasta los 150 minutos. A los 330 minutos los niveles plasmáticos de la corticosterona se igualan a los de los animales controles (Fig. 15).

Los niveles basales del número de leucocitos y del porcentaje de linfocitos y neutrófilos no muestran diferencias significativas entre los animales estresados prenatalmente y sus respectivos controles. A partir de los 60 minutos de iniciado el estrés postnatal, se observa una disminución significativa del número de leucocitos y del porcentaje de linfocitos en la sangre periférica, tanto en los animales estresados prenatalmente como en sus respectivos controles, con respecto a los valores basales. Este descenso continúa hasta los 150 minutos en el número de leucocitos y hasta los 330 minutos en el porcentaje de linfocitos. Los resultados se igualan a los valores basales correspondientes a los 330 minutos en ambos casos. El número de leucocitos es mayor en los animales estresados prenatalmente que en sus respectivos controles en los tiempos 120, 150 y 330 minutos, mientras que el porcentaje de linfocitos es mayor en los animales estresados prenatalmente que en sus respectivos controles en los tiempos 150 y 330 minutos (Fig. 16, 17).

Luego de los 20 minutos de estrés agudo los animales estresados prenatalmente muestran un descenso del porcentaje de neutrófilos con respecto a los valores basales. A partir de los 60 minutos se observa un aumento significativo del porcentaje de neutrófilos tanto en los animales estresados prenatalmente como en sus controles con respecto a sus valores basales, el que continúa hasta los 330 minutos. El porcentaje de neutrófilos es menor en los animales estresados prenatalmente que en sus respectivos controles en los tiempos 150 y 330 minutos (Fig. 18).

La relación neutrófilos / linfocitos basal no muestra diferencias significativas entre los animales estresados prenatalmente y sus controles. Los animales EP muestran

un aumento significativo de la relación neutrófilos / linfocitos a los 120 minutos, el cual continúa hasta los 330 minutos. Este aumento se produce a partir de los 90 minutos en los animales controles, y también continúa hasta los 330 minutos. La relación neutrófilos / linfocitos es menor en los animales estresados prenatalmente que en sus respectivos controles en los tiempos 150 y 330 minutos (Fig. 19).

Tercer experimento

Este experimento se realizó para investigar el efecto de un estrés prenatal físico, crónico, imprevisible e inescapable, en las crías macho adultas, sobre la influencia del sistema nervioso simpático en parámetros inmunes luego de una exposición aguda al mismo estrés.

Para determinar el efecto del estrés prenatal sobre la influencia Sistema Nervioso Simpático en la distribución de los leucocitos sanguíneos se estudió el efecto del bloqueo de los receptores adrenérgicos β con propranolol administrado previo al estrés postnatal, sobre la cantidad de glóbulos blancos y los subtipos de leucocitos en la sangre periférica.

EFFECTO DEL PROPRANOLOL SOBRE EL NÚMERO DE LEUCOCITOS SANGUÍNEOS EN RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE Y LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL

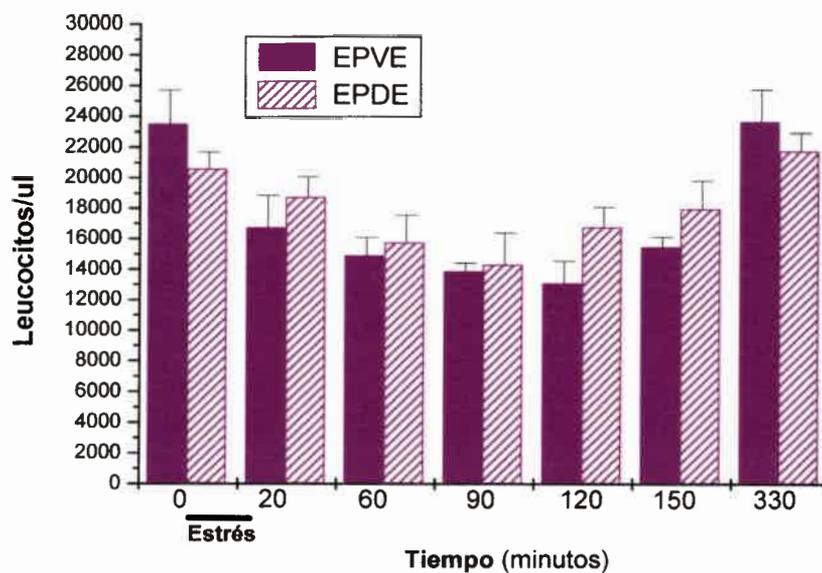


FIG. 20. Cambio en el número de leucocitos en la sangre periférica de las crías macho adultas inyectadas con propranolol EPBE ($n = 8$) o con el vehículo de la droga EPVE ($n = 4$), luego de la exposición al estrés agudo postnatal a lo largo de 310 minutos. Cada barra representa la media \pm S. E. M. n. s.

El análisis estadístico del perfil cinético del número de los leucocitos en los animales EP tratados con propranolol se realizaron usando un MANOVA de medidas repetidas de dos vías: tratamiento (administración de propranolol) y tiempo.

No se observó efecto del tratamiento ($F_{1,10} = 0,019$ $p = 0,89$), pero si se encontró diferencias entre los tiempos ($F_{6,60} = 13,54$ $p < 0,0000001$). La interacción entre los factores fue marginal ($F_{6,60} = 2,17$ $p = 0,058$).

EFFECTO DEL PROPRANOLOL SOBRE EL PORCENTAJE DE LOS LINFOCITOS SANGUÍNEOS EN RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE Y LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL

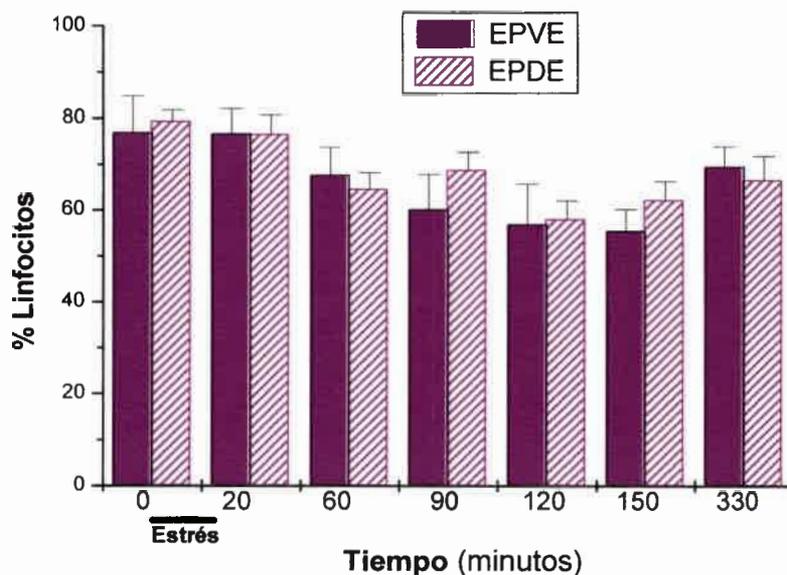


FIG. 21. *Cambio en los porcentajes de linfocitos en la sangre periférica de las crías macho adultas inyectadas con propranolol EPBE (n = 8) o con el vehículo de la droga EPVE (n = 4), luego de la exposición al estrés agudo postnatal a lo largo de 310 minutos. Cada barra representa la media ± S. E. M. n. s.*

El análisis estadístico del perfil cinético del porcentaje de los linfocitos en los animales EP tratados con propranolol se realizaron usando un MANOVA de medidas repetidas de dos vías: tratamiento (administración de propranolol) y tiempo

No se observó efecto del tratamiento ($F_{2,22} = 0,14$; $p = 0,87$), pero si se encontró diferencias entre los tiempos ($F_{6,132} = 16,19$; $p < 0,0000001$). La interacción entre ambos factores fue significativa ($F_{12,132} = 2,15$; $p < 0,018$).

EFFECTO DEL PROPRANOLOL SOBRE EL PORCENTAJE DE NEUTRÓFILOS SANGUÍNEOS EN RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE Y LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL

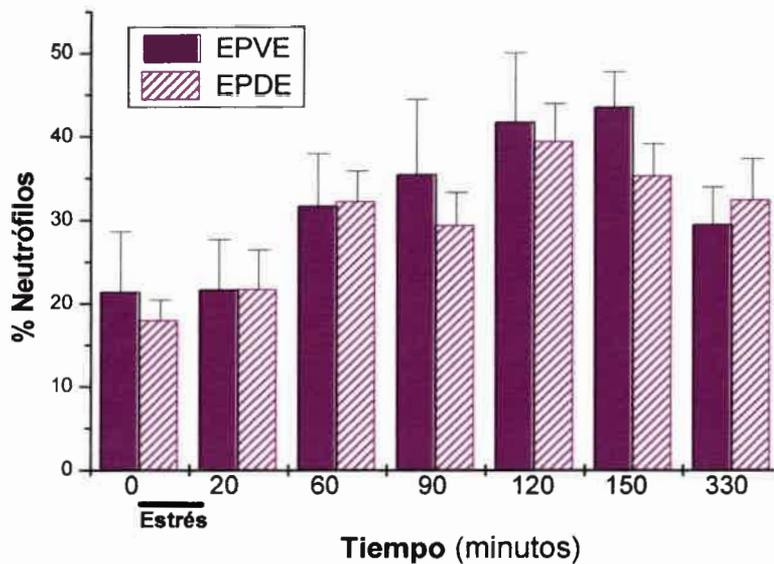


FIG. 22. *Cambios en el porcentaje de neutrófilos en la sangre periférica de las crías macho adultas inyectadas con propranolol EPBE (n = 8) y con el vehículo de la droga EPVE (n = 4), luego de la exposición al estrés agudo postnatal a lo largo de 310 minutos. Cada barra representa la media \pm S. E. M. n. s.*

El análisis estadístico del perfil cinético del porcentaje de los neutrófilos en los animales EP tratados con propranolol se realizaron usando un MANOVA de medidas repetidas de dos vías: tratamiento (administración de propranolol) y tiempo.

No se observó efecto del tratamiento ($F_{2,19} = 0,60$ $p = 0,56$), pero si se encontró diferencias entre los tiempos ($F_{6,114} = 14,42$; $p < 0,0000001$). La interacción entre ambos factores no fue significativa ($F_{12,114} = 1,64$; $p = 0,09$).

EFFECTO DEL PROPRANOLOL SOBRE EL PERFIL DE LA RELACIÓN NEUTRÓFILOS / LINFOCITOS SANGUÍNEOS EN RATAS ESTRESADAS PRENATALMENTE Y LUEGO DE LA EXPOSICIÓN A UN ESTRÉS AGUDO POSTNATAL

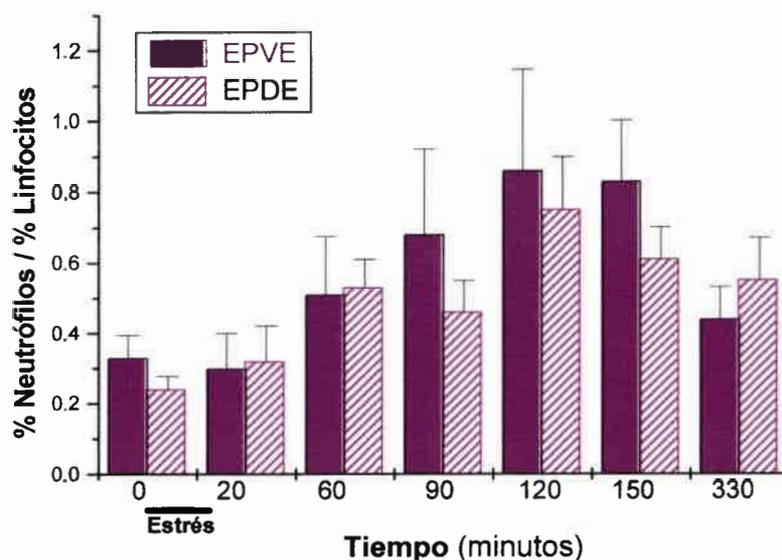


FIG. 23. *Cambios en la relación neutrófilos / linfocitos en la sangre periférica de las crías macho adultas inyectadas con propranolol EPBE (n = 8) y con el vehículo de la droga EPVE (n = 4), luego de la exposición al estrés agudo postnatal a lo largo de 310 minutos. Cada barra representa la media ± S. E. M. n. s.*

El análisis estadístico del perfil cinético de la relación neutrófilos / linfocitos en los animales EP tratados con propranolol se realizaron usando un MANOVA de medidas repetidas de dos vías: tratamiento (administración de propranolol) y tiempo.

No se observó efecto del tratamiento ($F_{2,19} = 0,28$ $p = 0,759$). Si hubo diferencias entre los tiempos ($F_{6,114} = 6,31$ $p < 0,000009$). La interacción entre ambos factores no fue significativa ($F_{12,114} = 1,46$ $p = 0,149$).

En ninguno de los parámetros estudiados (número de glóbulos blancos, % de linfocitos, % de neutrófilos y relación neutrófilos / linfocitos) se observó efecto puro de la droga ni del vehículo

Del análisis de los resultados de este experimento podemos concluir que el uso del propranolol, un bloqueante de receptores adrenérgicos β , no revierte los cambios del número de leucocitos (Fig. 20), el porcentaje de linfocitos (Fig. 21), el porcentaje de neutrófilos (Fig. 22) ni la relación neutrófilos / linfocitos (Fig. 23) de la sangre periférica obtenidos por la aplicación del estrés prenatal.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados sugieren que el eje HHA de las ratas EP está hiperactivo, ya que los niveles de la COR plasmática basal en las mismas, son mayores que los de sus correspondientes controles. Estos hallazgos son coincidentes con los de Clarke, A. y col. (1994); Fride, E., y col. (1986) y Peters, D. (1982). La hiperactividad encontrada, no se manifiesta en un aumento del tamaño total de la glándula adrenal, sino en una mayor relación corteza:médula en los animales EP. Este efecto del estrés en la hembra gestante, sobre el eje HHA de la cría, es posible porque los GC maternos atraviesan la placenta y llegan al feto, afectando el desarrollo adrenal del mismo y generando una mayor relación corteza:médula, tal como fue encontrado por Klemcke, H. y col. (1995). Por otro lado, la región fascicular de la corteza adrenal muestra una menor afinidad tintorial de sus células, como puede apreciarse en los cortes de la glándula adrenal. Estos hallazgos hacen presuponer que existiría una mayor secreción en esta zona glandular lo que sería coincidente con los resultados de otros autores como Pignatelli, D. y col. (1998) y Hausmann M. y col. (2000). Los primeros trabajando con cerdos, sometidos a estrés crónico, encontraron que la corteza adrenal sufre adaptación, la que se manifiesta por la hipersecreción de GC. Los segundos, encontraron lo mismo en cerdos tratados prenatalmente con ACTH, diseño experimental que replica, en esta especie, los efectos del estrés prenatal por restricción.

La hiperactividad del eje HHA podría haber sido generada por la disminución del número de receptores de GC presentes en el hipocampo (Maccari, S. y col., 1995), los cuales son el principal sustrato del control, por retroalimentación negativa, de la secreción de los GC adrenales. Así, una disminución de estos receptores de corticosteroides está acompañada por el aumento de la secreción de los GC. Por ello, el aumento de los niveles plasmáticos basales de la COR, que involucraría una resistencia a la retroalimentación negativa de los GC, podría ser considerado como un marcador de la intensidad del estrés crónico en la rata. (DeBoer, S. y col., 1990; Hennessy, M. y col., 1978; Kant, G. y col., 1983). En este sentido, se encontró que la secreción de COR inducida por el estrés en las ratas preñadas, provocaba una disminución de los receptores hipocampales RM pero no de los RG (Maccari, S. y col., 1995 y 2003;

Barazanges A. y col., 1996), en las crías adultas de esas madres. Estos receptores RM están generalmente involucrados en la regulación tónica de la liberación de la COR bajo condiciones basales (De Kloet E. and J. Reul, 1987), por lo cual, podría ser el mecanismo puesto en juego en la respuesta obtenida en nuestros estudios.

Otra causa posible de los efectos de los GC maternos sobre la respuesta del eje HHA de las crías, sería que esos altos niveles de la hormona pudieran modificar la secreción de los GC en las crías por una acción sobre el desarrollo de los sistemas noradrenérgicos centrales de las mismas. En este sentido, se conoce que el estrés prenatal aumenta el recambio de la NA en el cerebro de las ratas adultas (Takahashi, L. K. y col. 1992) y que esta hormona ejerce un control inhibitorio directo sobre los receptores de los GC hipocampales, facilitando así la secreción de COR (Maccari, S. y col., 1992; Yau, J. L. y J. R. Seckl, 1992).

En nuestros experimentos, la secreción disminuida de COR en los animales EP, cuando son expuestos postnatalmente al estrés que recibieron *in útero*, indica una habituación a ese estrés. Este resultado se fundamenta tanto en experimentos en los que se determinó la COR en plasma de ratas sacrificadas por decapitación como en aquellos en los que se obtuvieron muestras seriadas de un mismo animal a través del tiempo. Una respuesta en el mismo sentido fue encontrada por Pollard, I. (1984), y una tendencia a este mismo efecto, fue hallada Mc Cormick, C. y col. (1995). Estos últimos autores hallaron, además, en los mismos animales, un aumento de la ACTH plasmática significativamente menor en los animales EP que en sus CP, luego del estrés agudo.

Una de las causas que podría generar este hallazgo de que el EP produce un perfil de COR más bajo que el de sus controles, en respuesta al estrés agudo postnatal, podría ser una alteración de la sensibilidad de la corteza adrenal a la hormona ACTH causada por un "*down-regulation*" de los receptores de ACTH o una esteroidogénesis alterada en la glándula adrenal (Vázquez, D. M., 1992) Este efecto no se manifiesta en condiciones basales pero sí frente a un nuevo estrés cuando la glándula está más estimulada. Sin embargo, en nuestros experimentos hemos observado histológicamente que tanto los animales EP-C como los EP-E, poseen una zona fascicular con una vacuolización lipídica aumentada comparada con sus respectivos controles (CP-C y EP-C), lo que nos podría estar indicando una mayor secreción de glucocorticoides. Entonces, ¿cómo

explicamos la disminución del perfil de la COR circulante generado por el estrés agudo postnatal en los animales EP? Posiblemente este efecto se obtenga por otra de las posibles causas de la habituación como son las modificaciones en los procesos cognitivos manifestados como una reducción de la reacción emocional provocada por la persistencia de la situación estresante, lo que iría acompañado de la correspondiente reducción de la respuesta endócrina (Campmany. L., 1996). Como la habituación es específica para el estímulo aplicado crónicamente, el mecanismo determinante de la reducción de la respuesta sería sobre todo la familiarización al estímulo y la consiguiente reducción de la respuesta emocional asociada al mismo, reforzándose esta idea con los hallazgos de una aparente hiperactividad de la zona fascicular de las glándulas adrenales en los animales EP, tanto en condiciones basales como luego de la aplicación del IMO agudo.

Otro aspecto importante a tener en cuenta es que los receptores de COR, cuyo número disminuye en el hipocampo por el estrés prenatal son los RM, responsables, como ya dijimos, de la secreción tónica basal de esta hormona. El número de receptores RG hipocampales se mantiene igual después de la aplicación de estrés prenatal (Maccari y col., 1995; Barazanges A. y col., 1996). Este hallazgo es muy importante porque cuando hay niveles elevados de COR en la rata como los observamos durante el IMO agudo, los receptores que se van ocupando son los RG y es por eso que se consideran los responsables en relación con el bloqueo de la respuesta del eje HHA a las situaciones de estrés. (De Kloet E. y J. Reul, 1987). Estos dos aspectos mencionados anteriormente, nos permitirían entender los resultados de nuestros experimentos en los que se observa un descenso del pico de COR en los animales EP sometidos en el estado adulto al mismo estrés agudo. Coincidiendo con nuestros resultados, estudios llevados a cabo por Pfister, H. P. y J. L. Muir (1992) muestran que la exposición diaria al estrés durante la preñez produce una adaptación de la cría al mismo estrés aplicado postnatalmente.

Los animales EP mostraron una hiperglucemia basal en nuestros experimentos. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Vallée y col. (1996), en animales sometidos prenatalmente a inmovilización, en un ambiente iluminado, durante

la última semana de gestación. Esta hiperglucemia en nuestras ratas EP, podría ser el resultado de la hiperactividad basal del eje HHA, ya que hubo correlación positiva entre los niveles de la COR plasmática y la glucemia. Además otros investigadores han informado que se produce una disminución en la utilización periférica de la glucosa luego de la administración de GC (Long, C. y col., 1940; Mc Mahon, M. Y col., 1988) o de estrés (Munck, A., 1971).

Sin embargo, parte de nuestros resultados podría ser también la consecuencia de la activación sostenida del eje SAM en las crías EP al estado adulto, experimento a ser concretado a futuro. Como consecuencia de ello se libera adrenalina, hormona conocida por su efecto hiperglucemiante, entre otros.

El aumento de la glucemia, observado tanto en los animales EP como en sus respectivos controles CP, en respuesta a un estrés agudo preponderantemente físico como es el IMO, parece ser el resultado inmediato de la activación de la médula adrenal, con la liberación subsiguiente de adrenalina (Fukuda, M. y col., 1996) Este efecto probablemente esté mediado por receptores adrenérgicos α_2 . Sin embargo, en nuestros experimentos la aplicación del IMO agudo genera una hiperglucemia de la misma magnitud en ambos grupos. Este hallazgo se debe a que los animales del grupo CP responden a la aplicación del estrés agudo con un aumento del 43 % de la glucemia basal, mientras que los animales EP lo hacen con un aumento del 24 %. Esta diferencia en la respuesta postnatal tiene relación con la habituación de la actividad del eje HHA, ya que la correlación entre la COR y la glucemia fue positiva ($r = 0,7559$, $p < 0,0001$). La activación metabólica provocada por los sistemas SAM y HHA es opuesta a los efectos de la insulina y es por esa razón que en las situaciones de estrés se debe inhibir la secreción de insulina, al parecer mediante un efecto α adrenérgico directo, a nivel de las células β del páncreas (Porte, D. y R. P. Robertson, 1973).

Es bien conocido que la hiperglucemia, que parece estar mediada principalmente por la adrenalina, es un buen marcador de la intensidad del estrés en la rata (Armario, A. y col., 1990, 1986; De Boer, S. F. y col., 1989), por lo que podría pensarse que las crías EP perciben el estrés agudo con menor intensidad que las ratas que no fueron sometidas a estrés *in útero* y responden por lo tanto en menor proporción. Esto resulta muy importante ya que los buenos marcadores de estrés agudo, como lo es la hiperglucemia,

pueden ser de gran utilidad para investigar diferencias individuales en la respuesta al estrés. Esas diferencias individuales pueden ser el resultado de factores genéticos o de diversos factores ambientales, entre los que se cuenta la exposición de las madres gestantes a situaciones estresantes como ocurre en nuestros estudios. Además, los niveles de adrenalina y de glucosa sanguíneas son utilizados como marcadores de habituación cuando el animal es expuesto en forma repetida a un mismo estímulo (Armario, A. y col., 1988, 1986, 1990; De Boer, S. F., y col., 1989; Kant, G. J. y col., 1985; Kvetnansky, R., 1980) y no es sorprendente por lo tanto que reflejen la intensidad de la situación estresante.

En conclusión, las modificaciones que se producen a largo plazo, generadas por el EP, no solo inducirían efectos dramáticos sobre la regulación del eje HHA y del SAM en la cría adulta, sino además, como consecuencia de ellos se alteraría la regulación de la glucosa sanguínea.

Otro aspecto de fundamental importancia en este trabajo es la medición de los parámetros inmunes. En este sentido, hemos encontrado que la respuesta proliferativa de los linfocitos T está reducida en un 48 % en los animales EP en condiciones basales.

La exposición al estrés agudo postnatal, de los animales con estrés prenatal y sus controles al estado adulto, redujo la proliferación de los linfocitos T significativamente. La magnitud de esta reducción fue del 48 % en los primeros y del 52 % en los no estresados prenatalmente.

Si bien la proliferación de los linfocitos T requiere de la presencia de una glándula adrenal intacta (Wiegers, G. y col., 1993; Keller, S. y col., 1983), se ha visto que la capacidad proliferativa de estas células depende más de la COR circulante que de las aminas y opioides producidos por la glándula. Esto se comprobó por la reversión de la disminución de la respuesta proliferativa de los linfocitos T, en ratas adrenalectomizadas, cuando se realizaba la sustitución de GC a niveles semejantes a los basales (Wiegers, G. y col., 1993). Por otro lado, la presencia de altos niveles de COR en la sangre, obtenida por el uso de píldoras subcutáneas de la hormona, en ratas adrenalectomizadas, redujo la proliferación de estos linfocitos, estimulados con Con-A, a niveles casi nulos. En conclusión, las altas concentraciones *in vivo* e *in vitro* de la

COR suprimen la mitogénesis de los linfocitos T, mientras que las bajas concentraciones *in vivo* son estimulatorias. Estos efectos opuestos de la COR, enfatizan el rol regulatorio bimodal de esta hormona en la regulación inmune, la que puede ser medida por diferentes receptores de corticosteroides (Wiegiers y col., 1993).

Los efectos inmunosupresores descritos anteriormente son, al menos en parte causados por las acciones reguladoras de los GC en altas concentraciones, sobre los genes, los cuales reducen la síntesis de algunas linfoquinas y sus receptores (Munck, A. y col., 1990). Ejemplos importantes de esto son la disminución tanto del ARNm de la IL-2 (Arya, S. y col., 1984) como del ARNm del receptor de la IL-2 (Grabstein, K. y col., 1986) y la disminución de la capacidad de bloquear la síntesis de la IL-1 (Knudsen, P. y col., 1987). Como ya explicamos el mecanismo inmunosupresor de los GC se lleva a cabo a través de los receptores intracelulares RG, de estas hormonas. Estos receptores son abundantes en las células del sistema inmune. Así, los linfocitos T y B contienen de 3.000 a 5.000 receptores/célula (Homo-Delarche, F. y D. Duval, 1987). Además de los RG, hay en estas células RM, de alta afinidad, que se pueden unir a los GC y a los mineralocorticoides (Evans, R. y J. Arriza, 1989; Moguilewski, M. y J. Raynaud, 1980). Se ha descrito la presencia RM en el sistema inmune, por ejemplo en el bazo de la rata, en baja densidad (Miller, A. y col., 1990 y 1991) y Armanini, A y col. (1985), describieron la presencia de entre 180 y 400 sitios de RM /célula en los leucocitos mononucleares del ser humano. Estos resultados permiten fundamentar el rol inmunosupresor de los GC en altas concentraciones. Además, esta supresión está mediada por RG, ya que Miller, A. y col. (1991) y Wiegiers, G. y col. (1993) encontraron una correlación entre la amplia ocupación de los RG y la proliferación de los linfocitos T. De todas maneras según Miller, también estarían involucrados los RM. Estos hallazgos conducen a la idea de que la COR ejerce una acción potencial coordinadora, mediada por los dos tipos de receptores, sobre los linfocitos T sanguíneos. Esto ha sido previamente informado para otros tejidos de la rata, como el hipocampo (Joëls, M. y E. De Kloet, 1992; Barbazanges, A. y col., 1996), el colon (Turnamian, S. y H. Binder, 1989) y los leucocitos mononucleares en el hombre (Wehling, M. y col., 1992).

Con respecto al estudio de los glóbulos blancos encontramos que el número de leucocitos y la proporción de linfocitos y neutrófilos de la sangre periférica, en condiciones basales, no se modificó por el EP. Cuando estos animales son sometidos a estrés agudo, el número de leucocitos disminuye, el porcentaje linfocitos inicialmente aumenta, para luego disminuir; mientras que el porcentaje de los neutrófilos disminuye inicialmente y luego aumenta significativamente, habiendo una coincidencia en el sentido de estos resultados con los obtenidos, en animales adultos sin estrés prenatal, por Dhabhar, F. y col. (1996), Brosschot, J. (1992) y Mizobe, K. y col. (1997). Sin embargo, la reducción del número de glóbulos blancos y de los porcentajes de linfocitos y el aumento del porcentaje de los neutrófilos, es menor en los animales EP. Esta respuesta podría ser provocada por la habituación del eje HHA frente al estrés conocido.

Los diferencias en las respuestas de los neutrófilos y de los linfocitos, entre los animales EP y sus respectivos CP, se produjeron aproximadamente entre 2 y 2,5 horas después de alcanzar la COR los altos niveles característicos del estrés. Este retardo, podría deberse al mecanismo de acción de esta hormona, la cual, por su naturaleza lipídica ingresa a la célula blanco, se une a receptores citoplasmáticos y el complejo hormona-receptor formado migra rápidamente al núcleo, donde estimula la transcripción del ARNm para las proteínas que alteran la función celular. Todo este proceso genera una respuesta diferida en el tiempo con respecto al momento en que ejerce su estímulo sobre la célula blanco (Ganong, W., 2002).

La relación neutrófilo/linfocito, que es considerada un indicador de estrés (Gross, W. Y H. Siegel, 1983) es menor en los animales EP a los 150 y 330 minutos posteriores al estrés. Este resultado surge de un menor descenso del porcentaje de los linfocitos acompañado por un menor ascenso del porcentaje de los neutrófilos en la sangre, en esos tiempos. Nuevamente obtenemos una respuesta que podría estar indicando que el estrés agudo postnatal es percibido como menos estresante por los animales EP, por lo cual se genera en ellos una respuesta disminuida frente al mismo estresor.

Si bien el índice esplenosomático, obtenido en condiciones basales, en los animales EP fue igual que el de sus controles CP, lo cual coincide con una respuesta en el mismo sentido que el obtenido en los porcentajes de los linfocitos sanguíneos, podría

haberse producido una retención de linfocitos sanguíneos en el bazo, ya que se demostró que el número de células mononucleares por gramo de órgano fue significativamente mayor en los animales EP. Esta respuesta podría estar relacionada con la tendencia, en condiciones basales de un menor número de linfocitos sanguíneos en estos animales y podría responder a los mayores niveles basales de la COR plasmática en los mismos, lo cual favorecería la salida de los linfocitos del torrente sanguíneo para arribar a otros órganos inmunes, como el bazo, a fin de ponerse en el interior de los mismos en contacto con los antígenos. Estos hallazgos encuentran un soporte en los resultados obtenidos por Cox, J. y W. Ford (1982) quienes estudiaron el efecto de la prednisolona sobre la migración de los linfocitos y encontraron que el uso de este GC sintético en las ratas produjo una disminución en el número de linfocitos sanguíneos, acompañado por una retención de los linfocitos circulantes en el bazo, la médula ósea y los nódulos linfáticos.

Estos resultados se complementan con los hallazgos que sugieren que los cambios observados en el número de leucocitos de la sangre en animales expuestos a un determinado estrés, no son producidos por una destrucción a gran escala de los glóbulos blancos (Cohen, J., 1972; Dhabhar, F. y B. McEwen, 1996a; Dhabhar y col., 1995b), sino a una redistribución de los mismos.

Posiblemente, los cambios obtenidos en la redistribución de los leucocitos sean mediados por los cambios inducidos por el estrés tanto en la expresión como en la afinidad de las moléculas de adhesión sobre la superficie de los glóbulos blancos y /o de las células endoteliales.

Se ha visto que durante el estrés, las subpoblaciones específicas de leucocitos, las cuales son transportadas por la sangre y la linfa a través de diferentes compartimentos corporales, pueden ser retenidas selectivamente en aquellos compartimentos en los cuales ellas encuentran un grupo de moléculas de adhesión sobre la superficie de las células de un tejido endotelial. Como resultado de ello, la proporción de estas subpoblaciones de leucocitos podría disminuir en la sangre. Alternativamente, otras subpoblaciones de leucocitos pueden ser liberadas de ciertos compartimentos inmunes, por lo que su proporción podría aumentar en la sangre periférica (Dhabhar, F. y col., 1996). En este sentido Bauer, M. y col. (2001) encontraron que los niveles de

COR producidos por el estrés estaban correlacionados positivamente con la expresión de las integrinas de adhesión sobre subgrupos de células T periféricas. Ellos sugieren que la producción elevada de COR que se genera en respuesta al estrés agudo podría contribuir a cambiar la expresión de CAM sobre los linfocitos, promoviendo así la migración transendotelial de los mismos. Este fenómeno puede mediar los cambios en la distribución de células asociados con el estrés agudo y estaría sujeto a la habituación ante la exposición a un estrés repetido (Dhabhar F. y col., 1995), efecto que encontramos en nuestros estudios.

¿Qué significado puede tener la redistribución de los glóbulos blancos inducida por el estrés agudo, obtenida en nuestros estudios?. Para responder esta pregunta pueden ser útiles los resultados de Dhabhar F. y B. McEwen. (1996a), quienes hallaron que el estrés agudo induce un aumento significativo y persistente del número de leucocitos en el lugar donde se realizó una reacción de hipersensibilidad. Esto sugiere que la redistribución de los leucocitos inducida por el estrés, es uno de los factores que media el aumento de la inmunidad tisular, provocada por el mismo. Por ello, la menor cuantía de los cambios obtenidos en la redistribución de las células sanguíneas, obtenida en nuestros experimentos, como respuesta a la aplicación de un estrés agudo en los animales EP, podría traer como consecuencia una disminución en su capacidad de respuesta inmunológica.

Por otro lado, los resultados obtenidos por la aplicación del bloqueante β adrenérgico propranolol, previo al estrés agudo en los animales EP, podrían sugerir que la redistribución observada en los parámetros antes mencionados, no se debería a la acción de las CA sobre los leucocitos. Este hallazgo es coherente con lo encontrado por Weinstock, M y col. (1998), quienes no obtuvieron una correlación entre los índices de la actividad simpática y los niveles de la COR plasmática en los animales EP, después de la aplicación de un estrés postnatal, lo cual indicaría una activación diferencial de ambos sistemas en estos animales. En definitiva, la redistribución observada podría tener consecuencia significativa en la capacidad del sistema inmunológico de responder a nuevos desafíos y podría ser responsable, al menos en parte, de la disminución de la respuesta inmune en las crías de madres estresadas crónicamente.

CONCLUSIONES

- El estrés prenatal crónico por inmovilización en plancha produce la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en las crías macho adultas, en condiciones basales. Esta hiperactividad se manifiesta por una mayor secreción de corticosterona por parte de la glándula adrenal que muestra una relación corteza : médula aumentada, acompañada por una aparente hiperactividad de la región fascicular.
- El estrés prenatal crónico por inmovilización en plancha produce la habituación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal en las crías macho adultas, frente al mismo estrés aplicado en forma aguda. Esta habituación se manifiesta por una menor secreción de corticosterona en estos animales.
- Los animales estresados prenatalmente en forma crónica por inmovilización en plancha, muestran una hiperglucemia basal al estado adulto. Al ser sometidos al mismo estrés aplicado en forma aguda, presentan una hiperglucemia semejante a la de los controles. Este último efecto se debe a una menor respuesta al estrés agudo en los animales estresados prenatalmente.
- Los animales estresados prenatalmente muestran una menor proliferación de los linfocitos T en condiciones basales y postestrés. La consecuencia de estos resultados sería una menor capacidad funcional de los linfocitos de estos animales para responder a los antígenos que pudiesen ingresar al organismo.
- La redistribución de los leucocitos totales y de los granulocitos y agranulocitos observada en los animales estresados prenatalmente es compatible con una reducción de la posibilidad de estas células para abordar los órganos en los cuales se ponen en contacto con los antígenos, cuando son sometidos, en la vida adulta, al mismo estrés prenatal. Esta alteración se debería, al menos en parte, a la habituación en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal.

- Las catecolaminas, a través de los receptores β adrenérgicos, no serían responsables de la redistribución de los leucocitos sanguíneos en los animales estresados prenatalmente ya que la inyección del bloqueante β adrenérgicos propranolol no produjo cambios en la misma.

PERSPECTIVAS

- Uno de los aspectos más novedoso de nuestros hallazgos es la habituación del eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal de la cría estresada prenatalmente por IMO, cuando es expuesta al mismo estrés durante 20 minutos al estado adulto. Para tratar de dilucidar los mecanismos involucrados en la habituación una de las líneas a investigar sería la que permita cuantificar mediante estudios inmunohistoquímicos la presencia de corticosterona en la zona fascicular de la corteza adrenal.
- El fenómeno de la habituación repercute en la respuesta inmunológica de las crías estresadas prenatalmente y abre una nueva línea de investigación ya que se podría analizar el efecto de un estrés diferente al que se somete a las madres sobre los mismos parámetros que los del presente trabajo.
- Otro aspecto muy importante a profundizar es el mecanismo neuroendocrino responsable de las diferencias en la proliferación de los linfocitos T en cultivos en los animales estresados prenatalmente. Para ello se cultivarían los linfocitos T del bazo en presencia del bloqueante β adrenérgico propranolol, lo cual nos permitiría determinar si el Sistema Nervioso Simpático está involucrado en la respuesta proliferativa y si lo está, conocer en qué magnitud.
- Por otro lado sería interesante dilucidar el rol jugado por la COR inducida por el estrés, en estos cambios, usando un inhibidor de la síntesis de la misma, la cyanoketona (2- α -cyano-4,4,17- α -trimethyl-17- β -hydroxy-5-androsten-3-one). Este mismo inhibidor se podría usar cuando se estudia la redistribución de los glóbulos blancos.
- Además, se podría estudiar la funcionalidad de los receptores hipocampales de COR. Para ello se debería determinar el porcentaje de unión y la constante de disociación para receptores tipo I usando corticosterona tritiada y RU 28362 en exceso. Para evaluar la unión de los receptores tipo II se usará el RU 28362 tritiado.

- Se podría, además, intentar dilucidar qué moléculas de adhesión se activan con este tipo de estrés midiéndolas por marcación con anticuerpos fluorescentes en sangre entera y luego analizándolas con citometría de flujo. Por otro lado sería de interés estudiar la redistribución de los linfocitos hacia el Sistema Inmune Mucosal.



BIBLIOGRAFÍA

Ackerman, K. D., Bellinger, D.L., Felten, S. Y. and D. L. Felten. 1991. Ontogeny and senescence of noradrenergic innervation of the rodent thymus and spleen. See Ref. 1: 71-125.

Ader, R. and S. Plaut. 1968. Effects of prenatal maternal handling and differential housing on offspring emotionality, plasma corticosterone levels and susceptibility to gastric erosions. *Psychosom. Med.* 30: 277-286.

Aguilera, G. 1994. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 15: 321-350.

Akana, S., Shinsako, J. and M. Dallman. 1983. Relationships among adrenal weight, corticosterone, and stimulated adrenocorticotropin levels in rats. *Endocrinology.* 113: 2232-2237.

Armanini, D., Strasser, T. and P. Weber. 1985. Characterization of aldosterone binding sites in circulating human mononuclear leukocytes. *Am. J. Physiol.* 248 (Endocrinol. Metab. 11): E388-E390.

Armario, A., Hidalgo, J. and M. Giralt. 1988. Evidence that the pituitary-adrenal axis does not cross-adapt to stressors: comparison to other physiological variables. *Neuroendocrinology.* 47: 263-267.

Armario, A., Lopez-Calderón, A., Jolin, T. and J. Balasch. 1986. Response of anterior pituitary hormones to chronic stress. The specificity of adaptation. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 10: 245-250.

Armario, A., Martí, J. and M. Gil. 1990. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology*. 15:341-347.

Arya, S., Wong-Staal, F. and C. Gallo. 1984. Dexamethasone-mediated inhibition of human T-cell growth factor and gamma-interferon messenger RNA. *J. Immunol.* 33: 273-276.

Barbazanges, A., Piazza, P. V., Moal, M. L. and S. Maccari. 1996. Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J. Neurosci.* 16: 3943-3949.

Barlow, S. M., Knight, A. and F. M. Sullivan. 1978. Delay in postnatal growth and development of offsprings produced by maternal restraint stress during pregnancy in the rat. *Teratology* 18: 211-218.

Bauer, M., Perks, P., Lightman, S. and N. Shanks. 2001. Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution?. *Life Sciences.* 69: 11677-1179.

Black, P. H. 1994. Immune system-central nervous system interactions—effect and immunomodulatory consequences of immune system mediators on the brain. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 7-12.

Blalock, J. 1989. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine system. *Physiol. Rev.* 69: 1-32.

Bertuzzi, M.L., Bensi, N., Mayer, N., Niebyski, A., Armario, A., and H.F. Gauna. 2003. Renal mechanisms involved in the stress-induced antinatriuresis and antidiuresis in rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*. In press. 111 (2): 00-00.

Besedovsky, H. O., del Rey, A., Sorkin, E. and C. A. Dinarello. 1986. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*. 233: 652-654.

Blecha, F., Topliff, D. 1984. Lung delayed-type hypersensitivity in stressed mice. *Can. J. Comp. Med.* 48 (2): 211-214

Brosschot, J., Benschop, R., Godaert, G., Smet, M., Olf, M., Heijnen, C. and R. Ballieux. 1992. Effects of experimental psychological stress on distribution and function peripheral blood cells. *Psychosom. Med.* 54 (4): 394-406.

Campmany, L., Pol, O. and A. Armario. 1996. The effect of two chronic intermittent stressors on brain monoamines. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 53 (3): 517-523.

Chapman, R. H. and J. Stern. 1978. Maternal stress and pituitary-adrenal manipulations during pregnancy in rats: effects on morphology and sexual behavior of male offspring. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 92: 1074-1083.

Chrousos, G. and P. Gold. 1992. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA*. 267: 1244-1252.

Chrousos, G. 1995. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *N. Engl. J. Med.* 332: 1351-1362.

Chrousos, G. 2000. The stress response and immune function: clinical implications. *Ann. NY Acad. Sci.* 917: 38-67.

Chrousos, G. y L. Elenkov. 2000. Interactions of the endocrine and immune systems. In *Endocrinology*. 4th edit. L. DeGroot y L. Jameson, Eds. W. B. Saunders Co. Philadelphia.

Clarke, A. S., Wittwer, D. J., Abbott, D. H. and M. L. Schneider. 1994. Long-term effects of prenatal stress on HPA axis activity in juvenile rhesus monkeys. *Dev. Psychobiol.* 27: 257-269.

Clements, A. D., 1992. The incidence of attention deficit-hyperactivity disorder in children whose mothers experienced extreme psychological stress. *Georgia Educational Researcher.* 91: 1-14, 1992.

Coe, C. L., Kramer, M., Kirschbaum, C., Netter, P. and E. Fuchs. 2002. Prenatal stress diminishes the cytokine response of leukocytes to endotoxin stimulation in juvenile rhesus monkeys. *J. Endocrinol. Metab.* 87 (2): 675-681.

Coe, C. L., Lubach, G., Karaszewski, J. and W. Ershler. 1996. Prenatal endocrine activation alters postnatal cellular immunity in infant monkeys. *Brain Behav. Immun.* 10: 221-234.

Cohen, J. J. 1972. Timus-derived lymphocytes sequestered in the bone marrow of hydrocortisone-treated mice. *J. Immunol.* 108: 841.

Cox, J. and W. Ford. 1982. The migration of lymphocytes across specialized vascular endothelium. IV. Prednisolone acts at several points on the recirculation pathway of lymphocytes. *Cell. Immunol.* 66: 407.

Cratty, M. S., Ward, H. E., Johnson, E. A., Azzaro, A. J. and D. L. Birkle. 1995. Prenatal stress increases corticotropin-releasing factor (CRF) content and release in rat amygdala minces. *Brain Res.* 675: 297-302.

Dallman, M. F. 1993. Stress update. Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends. Endocrinol. Metab.* 4: 62-69.

Dantzer, R. 1997. Stress and immunity: what have we learned from psychoneuroimmunology. *Acta Physiologica Scandinavica*. 161 (640): 43-46.

Dantzer, R. y K. W. Kelley, 1989. Stress and immunity: an integrated view of the relationships between stress and the immune system. *Life Sci*. 44: 1995- 2008.

De Boer, S. F., Van der Gugten, J. and J. L. Slangen. 1989. Plasma catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in rats. *Physiol. Behav*. 45: 789-795.

De Boer, S. F., Koopmans, S., Slangen J. L. and J. Van der Gugten. 1990. Plasma catecholamine, corticosterone and glucose responses to repeated stress in rats: effect of interstressor interval length.. *Physiol. Behav*. 4: 1117-1124.

De Kloet, E. R. 1995. Esterooids, atability and stress. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 16: 416-425.

De Kloet, E. and J. Reul. 1987. Feedback action and tonic influence and corticosteroids on brain function: a concept arising from and heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology*. 12: 83-105.

De Kloet E. R, Oitzl, M. S. and B. Schobitz. 1994. Cytokines and the brain corticosteroid receptor balance – relevance to pathophysiology of neuroendocrine – immune communication. *Psychoneuroendocrinology*. 19: 121-134.

Deminiere, J., Piazza, P., Guegan, G., Abrous, N., Maccari, S., Le Moal, M. and H. Simon. 1992. Increased locomotor response to novelty and propensity to intravenous amphetamine self administration in adult offspring of stressed mothers. *Brain Res*. 586: 135-139.

Dhabhar F. 2000. Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity. The role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Ann N Y Acad Sci.* 917: 976-893.

Dhabhar F. and B. McEwen. 1999. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 1059-1064.

Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S. and R. L. Spencer. 1996. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. Role of adrenal steroid hormones. *The Journal of Immunology.* 157: 1638-1644.

Dhabhar, F. and B. S. McEwen. 1996a. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *J Immunol.* 156: 2608-2615.

Dhabhar, F. S., Miller, A. H., McEwen, B. S. and R. L. Spencer. 1995b. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. *The Journal of Immunology.* 154: 5511-5527.

Evans, R. and J. Arriza. 1989. A molecular framework for the actions of glucocorticoid hormones in the nervous system. *Neuron.* 2: 1105-1112.

Felten, D. L., Felten, S. Y., Bellinger, D. L., Carlson, S. L., Ackerman, K. D., Madden, K. S., Olschowka, J. A. and S. Livnat. 1987. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function. *Immunol. Rev.* 100: 225-260.

Fisher, L. and M. Brown. 1991. Central regulation of stress responses: regulation of the autonomic nervous system and visceral function by corticotrophin releasing factor. *Bailliere's Clin. Endocr. Metab.* 41: 35-50.

Fride E., Dan, Y., Feldon, J., Halevy, G. and M. Weinstock. 1986. Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepuberal and adult rats. *Physiology and behavior.* 37: 681-687.

Fukuda, M., Hata, A., Niwa, S., Hiramatsu, K., Honda, H., Nakagome, K. and A. Iwanami. 1996. Plasma vanillylmandelic acid level as an index of psychological stress response in normal subjects. *Psychiatry Res.* 63 (1): 7-16.

Giberson, P. K., Kim, K. and S. Hutchinson. 1997. The effect of cold stress on lymphocyte proliferation in fetal ethanol-exposed rats. *Alcohol Clin. Exp. Res.* 21 (8): 1440-1447.

Grabstein, K., Dower, S., Gillis, S., Urdal, D. and A. Larsen. 1986. Expression of interleukin 2, interferon- γ , and the IL-2 receptor by human peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 136: 4503-4508.

Gross, W. and H. Siegel. 1983. Evaluation of the heterophil/lymphocyte ratio as a measure of stress in chickens. *Avian Dis.* 27: 972-979.

Hausmann, M., Carroll, J., Weesner, G., Daniels, M., Matteri, R. and D. Lay Jr. 2000. Administration of ACTH to restrained, pregnant sows alters their pigs hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *J. Anim. Sci.* 78: 2399-2411.

Hennessy, M. and S. Levine. 1978. Sensitive pituitary-adrenal responsiveness to varying intensities of psychological stimulation. *Physiol. Behav.* 21: 295-297.

Henry, C., Kabbaj, M., Simon, H., Le Moal, M., and S. Maccari. 1994. Prenatal stress increases the hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to stress in young and adult rats. *J. Endocrinol.* 6: 341-345.

Homo-Delarche, F. and D. Duval. 1987. Glucocorticoid receptors in lymphoid tissue. In: *Hormones and Immunity*. Lancaster, PA: MTP. 1-19.

Irwin, M. 1994. Stress-induced immune suppression: Role of brain corticotropin releasing hormone and autonomic nervous system mechanisms. *Adv. Neuroimmunol.* 4: 29-47.

Jain, A., Zwickler, D., Hollander, C., Brand, H., Saperstein, R., Hutchinson, B., Brown, C., A. Audhya. 1991. Corticotropin-releasing factor modulates the immune response to stress in the rat. *Endocrinol.* 128: 1329-1336.

Joëls, M. and E. De Kloet. 1992. Control of neuronal excitability by corticosteroid hormones. *Trends Neurosci.* 15: 25-30.

Kant, G., Mougey, E., Pennington, L. and J. Meyerhoff. 1983. Graded footshock stress elevates pituitary cyclic AMP and plasma B-endorphin, B-LPH, corticosterone and prolactin. *Life Sci.* 33: 2657-2663.

Kant, G., Eggleston, T., Landman-Roberts, L., Kenion, C. Driver, G. and J. Meyerhoff. 1985. Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 22: 631-634.

Kay, G., Tarcic, N., Poltyrev, T. and M. Weinstock. 1998. Prenatal stress depresses immune function in rats. *Physiology and Behavior.* 63 (3): 397-402.

Keller, S. E., Weiss, J. M., Schleifer, S. E., Miller, N. E. and M. Stein. 1981. Suppression of immunity by stress: effect of a graded series of stressors on lymphocyte stimulation in the rat. *Science.* 213: 1397-1400.

Keller, S. E., Weiss, J. M., Schleifer, S. E., Miller, N. E. and M. Stein. 1983. Stress-induced suppression of immunity in adrenalectomized rats. *Science.* 221: 1301-1304.

Kennedy, S. and A. C. Collier. 1994. Stress-induced modulation of the immune response in the developing rat pup. *Physiology and Behavior*. 56 (4): 825-828.

Klein, S. L. and D. R. Rager. 1995. Prenatal stress alters immune function in the offspring of rats. *Dev. Psychobiol.* 28 (6): 321-336.

Klemcke, H. 1995. Placental metabolism of cortisol at mid-and late gestation of swine. *Biol. Reprod.* 3: 1293-1301.

Knudsen, P., Dinarello, C. and T. Strom. 1987. Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin 1 in U937 cells. *J. Immunol.* 139: 4129-4134.

Koehl, M., Darnaudey, M., Dulluc, J., Van Reeth, O. Le Moal, M. and S. Maccari. 1999. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J. Neurobiol.* 40 (3): 302-315.

Krey, L., Lu, K., Butler, W., Hotchkiss, J., Piva, F. and E. Knobil. 1975. Surgical disconnection of medial basal hypothalamus and pituitary in the rhesus monkey. II. Gh and cortisol secretion. *Endocrinology.* 102: 142-150.

Kvetnansky, R. 1980. Catecholamines an stress: Recent advances in Recent progress in catecholamines under stress. Usdin, E., Kvetnansky, R. and I. Kopin (Eds) Elsevier North. Holland. New York. pp 7.

Laudenslager, M. L., Ryan, S. M., Drugan, R. C., Hyson, R. L. and S. Maier. 1983. Coping and immunosuppression: inescapable but not escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. *Science.* 221: 568-570.

Lazarus, R. 1993. From psychological stress to the emotions: a history of changing outlooks. *Ann.Rev. Psychol.* 44: 1-9.

Lemaire, V., Taylor, G. and P. Mormede. 1997. Adrenal axis activation by chronic social stress fails to inhibit gonadal function in male rats. *Psychoneuroendocrinology.* 22 (8): 563-573.

Li Liu, Antai Li and S. G. Matthews. 2001. Maternal glucocorticoid treatment programs HPA regulation in adult offspring: sex-specific effects. *Endocrinology and Metabolism.* 280 (5): E729-E739.

Long, C., Katzin, B. and E. Fry. 1940. The adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocrinology.* 26: 309-344.

Maccari, S., Darnaudery, M., Morley-Fletcher, S., Zuena, A., Cinque, C. and o. Van Reeth. 2003. Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosc. and Biobehav. Rev.* 27: 119-127.

Maccari, S. 1999. Prenatal stress alters circadian activity of hypothalamo-pituitary-adrenal axis and hippocampal corticosteroid receptors in adult rats of both gender. *J. Neurobiol.* 40 (3): 302-315.

Maccari, S., Piazza, P. V., Kabbaj, M., Barbazanges, A., Simon, H. and M. Le Moal. 1995. Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *J. Neurosci.* 15: 110-116.

Maccari, S., Mormede, P., Piazza, P. V., Simon, H., Angelucci, L., and M. Le Moal. 1992. Hippocampal type I and type II corticosteroid receptors are modulated by central noradrenergic systems. *Psychoneuroendocrinology.* 17: 103-112.

Margni, R. 1996. *Inmunología e Inmunoquímica*. Editorial Médica Panamericana S. A. Buenos Aires. Argentina. 5ta Edición. Pp. 4-6

Martí, O. and A. Armario. 1998. Anterior pituitary response to stress: time-related changes and adaptation. *Int. J. Devl. Neuroscience*. 16 (3/4): 241-260.

McCormick, C. M., Smythe, J. W., Sharma, S. and M. J. Meaney. 1995. Sex specific effects of prenatal stress on hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress and brain glucocorticoid receptor density in adult rats. *Dev. Brain. Res.* 84:55-61.

McMahon, M., Gerich, J. and R. Rizza. 1988. Effects of glucocorticoids on carbohydrate metabolism. *Diabetes Metabol. Rev.* 4: 17-30.

Michajlovskij, N., Lichardus, B., Kvetňasnsky, R. and J. Ponec. 1988. Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake urine output and vasopressin changes in rats. *Endocrinologia Experimentalis*. 22: 143-157.

Miller, A., Spencer, R., Stein, M. and B. McEwen. 1990. Adrenal steroid receptor binding in spleen and thymus after stress or dexamethasone. *Am. J. Physiol.* 259 (Endocrinol. Metab. 22): E405-E412.

Miller, A., Spencer, R., Trestman, R., Kim, C., McEwen, B. and M. Stein. 1990. Adrenal steroid receptor activation in vivo and immune function. *Am. J. Physiol.* 261 (Endocrinol. Metab. 24): E126-E131.

Mizobe, K., Kishihara, K., El-Naggar, R., Madkour, G., Kubo, C., and K. Nomoto. 1997. Restraint stress-induced elevation of endogenous glucocorticoid suppresses migration of granulocytes and macrophages to an inflammatory locus. *J. Neuroimmunol.* 73: 81-89.

Moguilewski, M. and J. Raynaud. 1980. Evidence for a specific mineralocorticoid receptor in rat brain pituitary and brain. *J. Steroid. Biochem.* 12: 309-314.

Mormede, P., Dantzer, R., Michaud, B., Kelley, K. W. And M. LeMoal. 1988. Influence of stressor predictability and behavioral control on lymphocyte reactivity, antibody responses and neuroendocrine activation in rats. *Physiol.Behav.* 43: 577-583.

Munck, A., Mendel, D., Smith, L. and E. Orti. 1990. Glucocorticoid receptors and actions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 141: S2-S10.

Nelson, C. J. and D. T. Lysle. 1998. Severity, time, and beta-adrenergic receptor involvement in surgery-induced immune alterations. *J. Surg. Res.* 80 (2): 115-122.

Oitzl, M. S., van Haarts, A. D., Sutanto, W. and E. R. de Kloet. 1995. Corticosterone, brain mineralocorticoid receptor (MR) and the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis: the Lewis rats as an example of increased central MR capacity and a hyporesponsive HPA axis. *Psychoneuroendocrinology.* 20: 665-675.

Peters, D. A. V. 1982. Prenatal stress: Effects on brain biogenic amines and plasma corticosterone levels. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 17: 721-726.

Pfister, H. and J. Muir. 1992. Prenatal exposure to predictable novelty stress and oxytocin treatment effects offspring development and behavior in rats. *J. Neurosci.* 62: 227-241.

Pignatelli, D., Magalhaes, M. M. and M. C. Magalhaes. 1998. Direct effects of stress on adrenocortical function. *Horm. Metab. Res.* 30: 464-474.

Platzer, C., Docke, W., Volk, H. and S. Prosch. 2000. Catecholamines trigger IL-10 release in acute systemic stress reaction by direct stimulation of its promoter/enhancer activity in monocytic cells. *J Neuroimmunol.* 105 (1): 31-38.

Pollard, I. 1984. Effects of stress administered administered during pregnancy on reproductive capacity and subsequent development of the offspring in rats: prolonged effects on the litter of a second pregnancy. *J. Endocrinol.* 100: 301-306.

Porte, D. and R. P. Robertson. 1973. Control of insulin secretion by catecholamines, stress, and sympathetic nervous system. *Federation Proc.* 32: 1792.

Rajeev, J., Zwickler, D., Hollander, C., Brand, H., Saperstein, A., Hutchinson, B. and T. Audhya. 1991. Corticotropin-releasing factor modulates the immune response to stress in the rat. *Endocrinology.* 128 (3): 1329-1336.

Reul, J.M., Stec, I., Wieggers, G., Labeur, M., Linthorst, A., Arzt, E. and F. Holsboer. 1994. Prenatal immune challenge alters the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis in adult rats. *J. Clin. Invest.* 93(6): 2600- 2607.

Rodriguez, N. 2000. Efecto del estrés crónico en ratas gestantes sobre la madurez sexual de las crías macho. Tesis doctoral. Universidad Nacional de Río Cuarto.

Schell, I. 1981. Environmental noise and human prenatal growth. *Am. J. Physiol. Anthropol.* 56: 63-70.

Shelat, S., Aird, F. and E. Redei. 1997. Exposure to dehydroepiandrosterone in utero effects T-cell function in males only. *Neuroimmunomodulation.* 4 (3): 154-162.

Sobriana, S., Vaughna, V., Blochb, E. and L. Burtona. 1992. Influence of prenatal maternal stress on the immunocompetence of the offspring. *Pharmacol. Biochem. And Behavior.* 43 (2): 537-547.

Sobrian, S., Vaughn, V., Ashe, W., Markovic, B., Djuric, V. And B. Jankovic. 1997. Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. *Environ. Res.* 73 (1/2): 227-241.

Sprent, J. and D. Tough. 1994. Lymphocyte life-span and memory. *Science.* 265: 1395.

Stöhr, T., Schulte, D., Szuran, T., Pliska, V., Domeney, A., Welzl, H., Weiner, I. and J. Feldon. 1998. Differential effects of prenatal stress in two inbred strains of rats. *Pharmacol.Biochem. Behav.* 59: 799-805.

Stott, D. 1973. Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. *Dev. Med. Child. Neurol.* 5: 770-787.

Sudo, N., Yu, X. N., Sogawa, H. and C. Kubo. 1997. Restraint stress causes tissue-specific changes in the immune cell distribution. *Neuroimmunomodulation.* 4(3): 113-119.

Takahashi, L. K., Kalin N. H., Barksdale, C. M., Vander Burgt, J. A. and M. S. Brownfield, 1988. Stressor controllability during pregnancy influences pituitary-adrenal hormone concentrations and analgesic responsiveness in offspring. *Physiol. Behav.* 42: 323-329.

Takahashi, L. K., Baker, E. W. and N. H. Kalin. 1990. Ontogeny of behavioral and hormonal response to stress in prenatally stressed male rat pups. *Physiol. Behav.* 47: 357-364.

Takahashi, L. K. and N. H. Kalin. 1991. Early developmental and temporal characteristics of stress-induced secretion of pituitary-adrenal hormones in prenatally stressed rat pups. *Brain. Res.* 558: 75-78.

Takahashi, L. K., Turner, J. G. and N. H. Kalin. 1992. Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adults rats. *Brain Res.* 574: 131-137.

Takahashi, L. K., Turner, J. G. and N. H. Kalin. 1998. Prolonged stress-induced elevation in plasma corticosterone during pregnancy in the rat: implications for prenatal stress studies. *Psychoneuroendocrinology.* 23 (6): 571-581.

Torpy, D. J., Papanicolau, D. A., Lotsikas, A. J., Wilder, R. L., Chrousos, G. P. and S. R. Pillemer. 2000. Responses of the sympathetic nervous system and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to interleukin-6: a pilot study in fibromyalgia. *Arthritis Rheum.* 43 (4): 872-880.

Tuchscherer, M., Kanitz, E., Otten, W. and A. Tuchscherer. 2002. Effects of prenatal stress on cellular and humoral immune responses in neonatal pigs. *Veter. Immunol. and Immunopathol.* 86: 195-203.

Turnamian, S. and J. Binder. 1989. Regulation of active sodium and potassium transport in the distal colon of the rat. Role of the aldosterone and glucocorticoid receptors. *J. Clin. Invest.* 84: 1924- 1929.

Vallée, M., Mayo, W., Dellu, F., Le Moal, M., Simon H. and S. Maccari. 1997. Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. *The J. of Neuroscience.* 17 (7): 2626-2636.

Vallée, M., Mayo, W., Maccari, S., Le Moal, M. and H. Simon. 1996. Long- term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. *Brain research.* 712: 287-292.

Vázquez, D. M. 1992. The development of pituitary pro-opiomelanocortin gene and peptide expression: characterization and effect of repeated intermittent maternal isolation. *Neuroendocrinology*. 56: 320-330.

Von Hoersten, S., Dimitrijevic, M., Markovic, B. and B. Jankovic. 1993. Effect of early experience on behavior and immune response in the rat. *Physiol. Behav.* 54 (5): 931-940.

Ward, I., 1972. Prenatal stress feminizes and demasculinizes the behavior of males. *Science*. 175:82-87.

Wehling, M., Christ, M. and K. Theisen. 1992. Membrane receptors for aldosterone: a novel pathway for mineralocorticoid action. *Am. J. Physiol.* 263 (Endocrinol. Metab. 26): E974-E979.

Weinberg, J. and T. R. Jerrells. 1991. Suppression of immune responsiveness: sex differences in prenatal ethanol effects. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 15 (3): 525-531.

Weinstock, M., Matlina, E., Maor, G. I., Rosen, H. and B. S. McEwen. 1992. Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in the female rat. *Brain Res.* 595: 195-200.

Weinstock, M. 1997. Does prenatal stress impair coping and regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 21 (1): 1-10.

Weinstock, M., Poltyrev T., Schorer-Apelbaum, D., Men D. and R. McCarty. 1998. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. *Physiology and Behavior*. 64 (4): 439-444.

Weinstock, M., Razin M., Schorer-Apelbaum, D., Men D. and R. McCarty. 1998. Gender differences in sympathoadrenal activity in rats at rest and in response to footshock stress. *Int. J. Dev. Neurosci.* 16 (3-4): 289-295.

Weiss M., 1972. Psychological factors in stress and disease. *Scient. Amer.* 60: 104-108.

Wiegers, G., Croiset, G., Reul, J., Holsboer, F. and E. De Kloet. 1993. Differential effects of corticosteroids on rat peripheral blood T-lymphocyte mitogenesis in vivo and in vitro. *Am. J. Physiol.* 265 (Endocrinol. Metab. 28): E825-E830.

Williams, M., Davis, H., McCrea, A. and M. Hennessy. 1999. Stress during pregnancy alters the offspring hypothalamic, pituitary, adrenal, and testicular response to isolation on the day of weaning. *Neurotoxicol. And Teratol.* 21 (6): 653-659.

Yau, J. L. and J. R. Seckl. 1992. Central 6-hydroxydopamine lesion decrease mineralocorticoid, but no glucocorticoid gene expression in the rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* 142: 159-162.

Young, E. A., Kwak, S. P. and J. Kottak. 1995. Negative feed-back regulation following administration of chronic exogenous corticosterone. *J. Neuroendocrinol.* 7: 37-45.

Zarrow, M. X., Philpott J. E. and V. H. Denenberg. 1970. Passage of ¹⁴C-4-corticosterone from the rat mother to the foetus and neonate. *Nature.* 226 (250): 1058-1059.

ABREVIATURAS

A	adrenalina
Ach	acetil colina
ACTH	hormona adrenocorticotrofina
AVP	argininvasopresina
CA	catecolaminas
CBG	globulina fijadora de corticosteroides
Con A	concanavalina A
COR	corticosterona
CP	control prenatal
CPBE	animal sin estrés prenatal, con propranolol y estrés postnatal
CPVE	animal sin estrés prenatal, con vehículo de propranolol y estrés postnatal
CRH	hormona liberadora de corticotrofina
DHPG	dihidroxifenilglicol
DOP	dopamina
ELAM-1	E-selectina molécula de adhesión del endotelio
ENC	encefalina
EPBE	animal con estrés prenatal, propranolol y estrés postnatal
EPVE	animal con estrés prenatal, vehículo de propranolol y estrés postnatal
β END	β-endorfina
EP	estrés prenatal
GC	glucocorticoides
GH	hormona del crecimiento
HHA	hipotálamo-hipófiso-adrenal
ICAM-1	molécula de adhesión intercelular
ICAM-2	molécula de adhesión intercelular
IFN-γ	interferón-γ
IL-1	interleuquina-1
IL-2	interleuquina-2

IL-3	interleuquina-3
IL-4	interleuquina-4
IL-6	interleuquina-6
IL-8	interleuquina-8
IL-10	interleuquina-10
IMO	inmoviliación en plancha
LC	locus coeruleus
LFA-1	integrina
NA	noradrenalina
NA/LC	noradrenalina del locus coeruleus
NCF	factor quimiotáctico de los neutrófilos
NK	linfocitos asesinos naturales o " <i>natural killer</i> "
NP	nervios periféricos
NPV	núcleo paraventricular
PC	peso corporal
PMN	polimorfonucleares
POMC	proopiomelanocortina
PRL	prolactina
RG	receptores de glucocorticoides
RIA	radioinmunoensayo
RM	receptores de mineralocorticoides
SAM	simpático adrenomedular
SER	serina
SI	sistema inmunológico
SNC	sistema nervioso central
SNS	sistema nervioso simpático
SOM	somatostatina
Th	linfocito T helper
TNF- α	factor de necrosis tumoral α

U.N.R.C.
Biblioteca Central



60659

60659

