

73981

BRUN, NATALIA D.

Efecto del estres p:

2015

73981



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

MAESTRÍA EN ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA VETERINARIA

***“Efecto del estrés prenatal sobre la
regulación de la glucemia, algunos
parámetros del metabolismo lipídico
y el estrés oxidativo, en ratas
macho”***

Lic. Natalia D. Brun

Director: Prof. MSc Nora MAYER

Co-Director: Prof. Dra. Nancy RODRIGUEZ

2015

7.5331

MFL
Class:
T.948

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Molecular en el Área de Fisiología Animal, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto. Para optar por el título de Magister en Anatomía y Fisiología Veterinaria.

Jurado conformado por:

- Dra. CORREA, Silvia Graciela

- Dra. SCOPPA, Graciela Hilda



- Dra. LIAUDAT, Ana Cecilia.



AGRADECIMIENTO

Esta tesis esta dedicada, primero que todos a mis padres, Daniel y Graciela, por el apoyo y amor incondicional, por darme la oportunidad de poder seguir estudiando y por confiar en mi.

A mis tías, Mery y Lucia, por abrirme las puertas de su casa y adoptarme como un miembro más de la familia, en todos los sentidos, también por el apoyo incondicional y por confiar en mi.

A Nora y Nancy, por el apoyo, el empuje, por las largas charlas, por enseñarme todo lo que se y por la linda amistad que se ha formado.

A todos mis amigos de acá y los que están lejos, por bancarme, apoyarme, ayudarme y confiar en mí.

A la toda la gente del área de Fisiología Animal, que siempre me abrieron sus puerta para lo que necesité.

“La **mente**
que se abre
a una **NUEVA idea**,
jamás volverá,
a su **tamaño original**”

Albert Einstein

INDICE

Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
El estrés	10
Respuesta Neuroendócrina del estrés	12
Estrés prenatal	14
Síndrome Metabólico	15
- Dislipidemia	17
- Hipertensión	19
- Diabetes Mellitus	20
- Resistencia a la Insulina	20
- Intolerancia a la Glucosa	20
Estrés Oxidativo	21
Hipótesis y objetivos	25
Hipótesis	25
Objetivo General	25
Objetivos Específicos	25
Materiales y métodos	26
Obtención de los animales de experimentación	26
Preñez	26
Estrés Prenatal	27
Diseño Experimental	28
Primer Experimento	28

Segundo Experimento	29
- Determinación de COR por Radioinmunoensayo (RIA)	29
- Determinación de la Glucosa	34
- Determinación de la Insulina	34
- Determinación del Colesterol Total	39
- Determinación del HDL- colesterol	40
- Determinación del LDL- colesterol	41
- Índice Aterogénico	43
- Determinación de los Triacilglicéridos	43
- Determinación de MDA	44
Análisis estadísticos	46
Resultados	47
Discusión	57
Conclusiones	67
Abreviaturas	69
Bibliografía	71

RESUMEN

El bajo peso al nacer, una de las consecuencias del estrés prenatal, es un factor de riesgo de padecer el síndrome metabólico en la edad adulta. Este podría ser consecuencia del epigenoma, el cual podría constituir un importante factor que agrupe las diferentes patologías de este síndrome, como la dislipemia, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la hiperglucemia y el aumento del estrés oxidativo entre otras, en mamíferos adultos. El objetivo de esta tesis fue determinar el efecto del estrés prenatal sobre la regulación la glucemia, parámetros del metabolismo lipídico y del estrés oxidativo; y su relación con la actividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal, en ratas macho adultas. Se utilizaron ratas macho albinas (Wistar) de 3 meses de edad, hijas de madres sometidas a estrés crónico por inmovilización en plancha (IMO), durante las dos últimas semanas de preñez (EP) y sus controles no estresados (CP). El primer experimento consistió, en la extracción de sangre, a cada grupo, por capilaridad en tubos heparinizados, de los vasos sanguíneos de la cola en forma seriada (0, 10, 20, 30, 60 y 90 minutos), luego de la administración de la solución de glucosa al 40 % por vía oral (1 g/kg) con un ayuno de 12 hs. En el segundo experimento, a cada grupo, se le extrajeron muestras de sangre por decapitación, las que fueron colocadas en tubos con EDTA para la obtención de plasma, a fin de determinar niveles plasmáticos de corticosterona (COR), glucosa, insulina, colesterol total, lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol), lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol), triacilglicéridos (TAG) y el índice aterogénico. Luego se extrajo el hígado para determinar el estrés oxidativo (EO) teniendo como indicador de peroxidación lipídica al malondialdehido (MDA). El análisis de los parámetros evaluados nos permite concluir que el estrés crónico por IMO en ratas macho adultas, produce hiperglucemia, hiperinsulinemia, disminución de la tolerancia a la glucosa, incremento en los valores de COR, HDL-colesterol, LDL-colesterol, TAG, un aumento en el índice aterogénico y del EO. En conclusión, el estrés prenatal crónico por IMO, en ratas macho adultas, produce alteraciones en los parámetros involucrados en la regulación de la glucemia, el metabolismo de los lípidos y el estrés oxidativo hepático.

Abstract

The low birth weight, one of the consequences of prenatal stress is a risk factor for metabolic syndrome in adulthood. This could be a consequence of the epigenome, which is an important factor involved to different pathologies of this syndrome, such as dyslipidemia, insulin resistance, glucose intolerance, hyperglycemia and increased oxidative stress, in adult mammals. The aim of this thesis was to determine the effect of prenatal stress on blood glucose regulation, parameters of lipid metabolism and oxidative stress; and its relation to the activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult male rats. Male albino rats (Wistar) 3 months of age, offsprings of mothers undergoing chronic immobilization in iron (IMO) during the last two weeks of pregnancy (EP) and unstressed controls (CP) were used. The first experiment consisted in drawing blood serially (0, 10, 20, 30, 60 and 90 minutes) to each group, into heparinized capillary tubes after administration of 40% glucose orally (1 g / kg) with a fast of 12 hours. In the second experiment, animals were decapitated and the blood samples were placed in tubes containing EDTA for plasma collection, to determine plasma levels of corticosterone (COR), glucose, insulin, total cholesterol, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL) cholesterol, triacylglycerol (TAG) and the atherogenic index. Liver was then extracted to determine oxidative stress (OS) based on an indicator of lipid peroxidation to malondialdehyde (MDA). The analysis of the evaluated parameters allows us to conclude that chronic stress by IMO in adult male rats produces hyperglycemia, hyperinsulinemia, impaired glucose tolerance, increased COR values, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, TAG, and increase atherogenic index and EO. In conclusion, chronic prenatal stress by IMO, in adult male rats results in alterations in the parameters involved in the regulation of blood glucose, lipid metabolism and hepatic oxidative stress.

INTRODUCCIÓN

El ambiente intrauterino juega un papel importante en la salud de la descendencia. Eventos estresantes, ya sean de índole social, físicos o psicológicos, sufridos por el feto, pueden provocar, en él, alteraciones fisiológicas y/o conductuales a largo plazo. Los estudios realizados en humanos revelan que los hijos de madres que sufrieron condiciones adversas durante su primer trimestre de embarazo muestran efectos de escasa magnitud, mientras que los hijos cuyas madres estuvieron expuestas al estrés durante el tercer trimestre de embarazo presentan consecuencias a largo plazo, tales como malformaciones del corazón, pérdida de la audición, anomalías esqueléticas y bajo peso al nacer (Talge y col., 2007). Este último aspecto, fue hallado también en animales (Rodríguez, N. y col., 2007). El bajo peso al nacimiento es un factor de riesgo de padecer el síndrome metabólico (SM) en la edad adulta (Hwang, IS y col., 1987; Eckel, RH y col., 2005; Alberti, K.G. y col., 2006). Por otro lado, algunos hábitos, como el consumo de tabaco pueden aumentar el riesgo de muerte fetal, la cual es más común en mujeres que sufren estrés (Wisborg K. y col., 2008).

La programación *in útero* o inmediatamente después del nacimiento, podría dar origen al epigenoma. El epigenoma emerge en periodos de desarrollo fetal o neonatal, por la interacción entre el genoma heredado y factores externos (ej.: miedo, maltrato, etc), nutrientes (ej.: desnutrición) u hormonas (ej.: cortisol o corticosterona).

El epigenoma, podría constituir un importante factor que agrupe las diferentes patologías conocidas como el síndrome metabólico, las cuales se producen en mamíferos adultos. Se destacan, entre ellas, la dislipemia, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la hipertensión y/o las alteraciones cardiovasculares (Grundy, S.M., 1998), la hiperglucemia (Song D. y col., 2004) y la hiperuricemia, (Pascual-Leonel, A.M. y col, 2009; Levitt N. S. y col., 2000; Kapoor A. y col., 2006; Sanchez-Lozada L., 2007).

También se ha comprobado que la obesidad, el estrés prolongado, la diabetes y las enfermedades cardiovasculares, entre otras, son algunas de las causas del aumento del estrés oxidativo (EO) (Baez-Duarte, B., 2011). Este aumento es debido a un desequilibrio y predominio de los radicales libres (RL), que son especies químicas que poseen un electrón desapareado en su última capa, lo que les permite reaccionar con un elevado número de moléculas de todo tipo, primero oxidándolas y después atacando sus estructuras. Estos RL, han sido implicados como importantes mediadores patológicos en un gran número de trastornos clínicos. Por otro lado, se ha demostrado una estrecha relación entre los RL y las lipoproteínas de baja densidad (LDL- colesterol), cuyo aumento tiene un relevante valor predictivo directo en la aparición de aterosclerosis temprana (Marsland y col., 2002). Los productos finales de la peroxidación lipídica pueden reaccionar con proteínas y ácidos nucleicos, alterar su función y dar origen al daño celular (Céspedes y col., 2008).

Es importante destacar que las ratas utilizadas en nuestro experimento, son consideradas mamíferos HDL-colesterol (lipoproteína de alta densidad) (Martínez, L.O. y col., 2004; Maldonado, E. N. y col., 2002), por lo cual, son animales que se muestran resistentes al riesgo aterogénico. Sin embargo, cuando son sometidas a un período de estrés crónico por inmovilización en plancha (IMO) (Michajlovskij, N. y col., 1988), demuestran una mayor propensión a la dislipemia, a la aterogénesis y al EO (Scoppa H. G., 2010).

EL ESTRÉS

Desde hace varias décadas, y sobre todo en la actualidad, la ciencia en sus diversas disciplinas (medicina, psicología, sociología, etc.) ha estudiado el fenómeno del estrés, y aunque su uso se ha hecho frecuente en el lenguaje cotidiano y científico, aun existen dificultades para delimitar un concepto claro del mismo. Allá por los años 30, uno de los pioneros en estudiar el estrés, fue un estudiante de medicina de la Universidad de Praga, *Hans Selye*, quien observó que todos sus pacientes enfermos, independientemente de la

enfermedad que padecían, presentaban los mismos síntomas (cansancio, pérdida de apetito, descenso de peso, etc). A este conjunto de síntomas lo llamó "Síndrome de estar enfermo". Unos años más tarde, *Selye*, definió el concepto de estrés como, *la respuesta no específica del organismo frente a cualquier demanda que se realice sobre él*. El término estrés designaría un estado o variable intermedia entre el estímulo estresante y las respuestas que desencadenan dicho estímulo.

Un concepto más amplio es el desarrollado por *Vigas, M.* (1980), quien considera al estrés como "el estado de emergencia del organismo provocado por estímulos externos o internos, reales o simbólicamente nocivos que desembocan en una respuesta característica, la cual se ha desarrollado en el curso de la filogenia y tiene primariamente valor adaptativo".

El agente estresante es llamado estresor (que puede ser de naturaleza física, medioambiental, psicológica o social) y la respuesta al mismo. Esta última, puede definirse como el conjunto de reacciones fisiológicas y conductuales dirigidas a restablecer la homeostasis del organismo y está determinada por la percepción que el organismo tiene del estímulo estresante correspondiente (*González Gómez y Escobar, 2002*).

El estrés actúa como una señal de alarma generada en el cerebro, que detecta el peligro en el medio e indica que se requiere de una acción inmediata. Cuando la respuesta a esta acción no se da de manera adecuada y con la rapidez necesaria, se producen condiciones patológicas, físicas y/o psicológicas, como depresión, ansiedad, alteraciones del ritmo cardíaco y respiratorio, úlceras gastrointestinales, alteraciones en el peso, cansancio, hipertensión, entre otros, que interfieren con el bienestar y la salud. (*Chrousos, G., 2000; Muñoz-Abellan, C. y col., 2009*).

La inminente presencia de un evento amenazante genera una respuesta neurofisiológica del individuo la cual intervienen en la activación de los sistemas nervioso central (SNC), autónomo y neuroendocrino (*Hernández Mata y Leonardo, R., 2002*).

RESPUESTA NEUROENDOCRINA AL ESTRÉS

El SNC desempeña un papel fundamental en la integración de la respuesta a situaciones estresantes de cualquier naturaleza. En estas condiciones, aparecen una serie de cambios fisiológicos, cuyo posible valor adaptativo o cuyas implicancias patológicas están, en muchos casos, por establecerse. Sin embargo, existe un amplio consenso respecto de la importancia funcional y patológica de algunos sistemas fisiológicos que se consideran típicos del estrés como la liberación de los glucocorticoides (GC) y las catecolaminas (CA). El conocimiento de los cambios fisiológicos que genera el estrés es importante, porque estas alteraciones pueden utilizarse como marcadores biológicos del mismo y constituyen un aspecto de gran importancia para valorar las diferencias individuales en la respuesta o el nivel de estrés ocasionado por un estresor determinado (Armario, A. y col., 2004). La respuesta cumple una misión protectora y es activada de forma instantánea (Moscoso, M., 2009). Dicha activación está dada por dos ejes, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y el eje simpático-adreno-medular (SAM) (Marquez, C. y col, 2004). Los estímulos estresantes llegan vía receptores α -adrenérgicos hasta la eminencia media del hipotálamo, específicamente en el núcleo paraventricular (PVN) donde se inicia la producción de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y arginina-vasopresina (AVP). La CRH entra en el sistema portal hipofisario que une el hipotálamo con la glándula pituitaria anterior y en unos segundos, activa a esta última, que es la encargada de liberar la hormona adrenocorticotropa (ACTH). Esta hormona deriva de la molécula de proopiomelanocortina (POMC) (Carlson, N., 1996; Leng, G. y Russell, A., 1998, Owen, D. y col, 2005). La ACTH, a su vez, estimula la secreción de GC en la corteza de la glándula adrenal. En la rata, el principal GC secretado por la corteza adrenal es la corticosterona (COR).

Finalmente, los GC ejercen una retroalimentación negativa a nivel del hipocampo, el PVN y la pituitaria anterior. Para ello, existen receptores de glucocorticoides (GR) en las tres áreas expresadas anteriormente y además,

receptores de mineralocorticoides (MR) en el hipocampo, que permiten regular la actividad del eje HHA evitando el exceso de los GC, lo cual podría provocar daños en distintos órganos (Pascual, A. y col, 2009).

Otros componentes que actúan en respuesta al estrés son la noradrenalina (NA) y la adrenalina (A). La NA del locus ceruleus (LC) y las neuronas autonómicas del sistema simpático central, ejercen su efecto estimulando tanto al sistema nervioso simpático sistémico (SNS) como al SAM, los cuales producen las CA: NA y A (Constantine, T. y Chrousos, G. 2002). La A cerebral sirve ampliamente como un sistema de alarma que disminuye las funciones neurovegetativas, como comer y dormir, y acompaña a los aumentos de las respuestas autonómicas y neuroendócrinas al estrés, incluyendo la activación del eje HHA (Chrousos, G., 1998). La NA también activa la amígdala, la principal área cerebral relacionada a las conductas asociadas al miedo y mejora el almacenamiento a largo plazo, de la memoria cargada de emociones adversas, en sitios tales como el hipocampo y cuerpo estriado (Constantine, T. y Chrousos, G., 2002).

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 adapta al organismo al estrés, lo cual produce modificaciones en la glucemia, en la función cardiovascular, en la termogénesis y en la función inmune innata y adaptativa (Chrousos, G. y P. Gold, 1992; Chrousos, G., 2000).

En los animales estresados, se pierde el ritmo circadiano del patrón secretor fisiológico del sistema endócrino, para poner en marcha los mecanismos de protección o adaptación ya descritos, afectando así múltiples funciones esenciales del organismo (Álvarez Díaz y col., 2004).

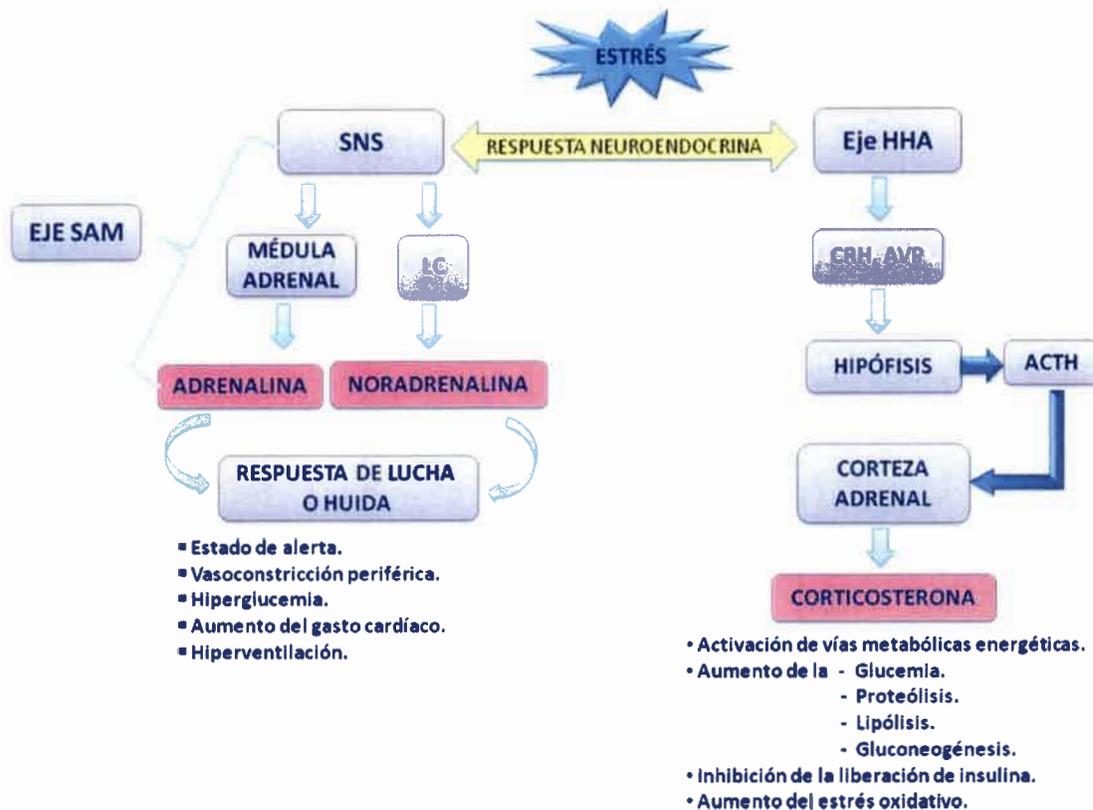


Fig. 1: Respuesta Neuroendocrina al estrés

ESTRÉS PRENATAL

El estrés sufrido por el feto durante su desarrollo puede conducir a cambios permanentes en diferentes aspectos de la fisiología del mismo, incluyendo el metabolismo, cuyas consecuencias se observan en la vida postnatal (Hall, J.G., 2007; Bloomfield, F.H., 2011). Estas alteraciones dependen de la naturaleza, la intensidad y la duración del estresor al cual está expuesta la hembra gestante. Evidencia bibliográfica indica que el estrés durante la gestación puede estar asociado con una mayor incidencia de partos prematuros y bajo peso al nacer en humanos (Bonari, L. y col., 2004; Dorthe, H. y col., 2007) y en animales (Rodríguez, N. y col., 2007; Weinstock, M., 2008) produciendo, además, alteraciones en el ritmo cardíaco (Van de Bergh y col., 2005). Por otro lado, se ha encontrado una importante incidencia del estrés



prenatal (EP) sobre problemas emocionales en la descendencia, como la ansiedad y la depresión (Kendler, K. y col., 1999; Koenen, K. y col., 2002, 2007; Gilmer, W. y col., 2005), reconociéndose, cada vez más, que los cambios en la función ejecutiva y la capacidad cognitiva, son también características representativas de los trastornos del estado de ánimo y la ansiedad (Coles, M.E, Heimberg, R.G., 2002). Otros autores encontraron que genera dificultades en el aprendizaje y la memoria, afectando la regulación de los procesos cognitivos (Rice, F. y col., 2007; de Quervain, D. y col., 2009) que incluyen el miedo y su extinción (McIntyre, C.K. y col., 2002; Mueller, D. y col., 2008; Gourley, S. y col., 2009).

Mediante estudios epidemiológicos y con animales, se demostró que los factores genéticos, emocionales y las interacciones que se perciben entre ellos, pueden afectar el éxito de una gestación y en consecuencia el desarrollo fetal (Fowden, A. y col. 2006). En animales de experimentación, que fueron sometidos a un estrés crónico *in útero*, se observaron alteraciones en el comportamiento social y en el eje HHA (Romanini, M. y col, 2007), en el eje hipotálamo-hipófiso-Gonadal (HHG) (Rodríguez, N. y col., 2007; Chen, S. y col., 2013) y en la inmunidad (Mayer, N., 2011; Liaudat, A.C. y col., 2012), así como también, en los procesos centrales cerebrales relacionados con la cognición, la memoria y la habituación (Zubilete, Z. y col., 2006).

EL SÍNDROME METABÓLICO

Factores ambientales y el estilo de vida, influyen en el desarrollo perinatal del animal y pueden causar cambios estructurales y funcionales en el mismo, que persisten a lo largo de toda la vida. Como dijimos, en la actualidad se ha desarrollado el término "epigenoma", el cual fue acuñado en 1939 por Waddington, H., quien lo definió como "el estudio de todos los eventos que llevan al desenvolvimiento del programa genético del desarrollo" o el complejo "proceso de desarrollo que media entre el genotipo y el fenotipo" (Waddington, C.H., 1941). En 2002, Holliday, R., definió la epigenética, como el estudio de

los cambios en la función de los genes que son heredables por mitosis y/o meiosis, que no entrañan una modificación en la secuencia del ácido desoxirribonucleico (ADN) y que pueden ser reversibles.

Actualmente, se reconoce el papel fundamental que el ambiente extranuclear, extracelular y social ejercen en la modulación de la actividad genética (Shonkoff, J.P. y Phillips, D.A., 2000). Esto hace referencia a la interacción entre el genoma heredado y los factores externos, nutrientes u hormonas que son capaces de modificar, no la secuencia de los nucleótidos del ADN de un gen, sino de generar pequeños cambios químicos en su estructura (Weaver I. C. G. y Meaney M. J., 2004, Pascual-Leonel, A.M., 2007), a través de las metilaciones de nucleótidos o las acetilaciones de histonas. Más recientemente, se han descubierto ácido ribonucleicos (ARNs) no codificadores denominados micro ARNs que son importantes en la regulación de la activación y silenciamiento de los genes (Bedregal, P. y col, 2010). Debido a ello, el ADN expresa el mismo producto pero cambia su actividad, lo cual modula la expresión de ese producto a la alza o a la baja (Pascual, A.M. y col., 2009). Estas modificaciones se conocen como epimutaciones (Bedregal, P. y col, 2010)

Un avance en la comprensión de la relación entre los genes y el ambiente se produjo con los descubrimientos de las bases moleculares epigenéticas que controlan la activación y el silenciamiento de los genes (Holliday, R., 2006).

Se sabe que las modificaciones epigenéticas participan en un importante número de procesos, como por ejemplo, en la adquisición de memoria inmunológica de los linfocitos T (Rousseaux, R. y Col., 2008), en las bases neurobiológicas de la memoria, el aprendizaje y en la respuesta al estrés mediada por el eje HHA (Miller, C.A. y Col. 2008). También se han asociado mecanismos epigenéticos a enfermedades psiquiátricas como la esquizofrenia y la depresión (Stuffrein-Roberts, S. y Joyce, PR., 2008). Otras enfermedades involucradas en el estudio de estos mecanismos son el cáncer y algunas patologías neurológicas. (Bedregal, P. y col., 2010)

Los cambios epigenéticos asociados con las enfermedades se producirían a lo largo de la vida. Sin embargo, la labilidad del estado epigenético de los primeros estadios del desarrollo, lleva a plantear la hipótesis que la asociación de los eventos adversos al inicio de la vida, con una predisposición a enfermedades, está mediada por mecanismos epigenéticos (Razin A., y Riggs, A.O., 1980; McEwen, B.S., 2008). Las evidencias de los trabajos en animales, aportados por el grupo de Meaney, M. y col. (2007) y el de Gluckman, P. y col. (2008) hacen plausible este planteamiento.

Es conocido que el eje HHA se programa en el período perinatal, de manera que los cambios en él, no pueden revertirse en el período adulto (Mayer, N. y col., 2011). Existe evidencia que indica que los niños, cuya madre ha sufrido maltrato durante la gestación, tienen una respuesta alterada al estrés a largo plazo, por fallas en la regulación del eje HHA. Esto se explicaría, por la metilación del gen NR3C1, que es un receptor de los glucocorticoides involucrados, en particular, con alteraciones en las respuestas autonómicas (Oberlander, T. y col., 2008).

Dicha programación perinatal podría ser un elemento integrador para las patologías del SM, las cuales, muchas veces, se producen en los mamíferos adultos nacidos con bajo peso (Berthold, K. y col., 2005; Pascual, A.M. y col., 2009). Por ello, los animales que nacen con bajo peso, padecen en la edad adulta, dislipidemia, hipertensión, alteraciones cardiovasculares y/o diabetes mellitus, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Hwang, IS y col., 1987; Eckel, RH y col., 2005; Alberti, K.G. y col., 2006). A continuación haremos una breve descripción de cada uno de los parámetros antes mencionados.

- Dislipidemia

Es un trastorno en el metabolismo de los lípidos de la sangre (Soca, P., 2009), caracterizado por concentraciones elevadas de los triacilglicéridos (TAG), un descenso de las concentraciones de las lipoproteínas de alta

densidad (HDL-colesterol) y elevados niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) (Ordovas, J. y Corrella, D., 2005; Scott, M y col., 2004). Esto ocurre en los humanos, ya que en el caso de las ratas, como mencionamos anteriormente, son mamíferos HDL-colesterol, siendo los valores de esta última lipoproteína elevados.

Los TAG son el principal tipo de lípido transportados por la sangre en el organismo. Este, digiere las grasas de los alimentos y libera los TAG a la sangre, que son utilizados como fuente de energía o almacenados como grasas. El hígado también puede producir TAG, algunos de los cuales dan origen al colesterol (Ganong, W., 2010).

El colesterol es un lípido de gran importancia, tanto para la morfología como para la fisiología de la célula, así como para el correcto desarrollo de los organismos. Es uno de los constituyentes principales de la membrana celular y un importante precursor de las hormonas esteroideas y de los ácidos biliares (Brown, M. y Goldstein, J.L., 1986).

El colesterol y otras grasas son transportados en el torrente sanguíneo en forma de partículas esféricas llamadas lipoproteínas. Como ya mencionamos anteriormente, dos de las lipoproteínas involucradas en esta patología del SM, son las LDL-colesterol y las HDL-colesterol. Estas lipoproteínas, son complejos miscelares macromoleculares constituidos por lípidos (colesterol, TAG y fosfolípidos), unidos a proteínas específicas denominadas apolipoproteínas. De esta manera, los lípidos, que son compuestos hidrofóbicos, pueden ser vehiculizados a través de fluidos acuosos, como aquellos que se encuentran en los compartimientos intra y extra vasculares (Schreier, L. y col., 2005; Salazar, D., 2009). Asociadas a las lipoproteínas, existen, enzimas y proteínas transportadoras de lípidos, que intervienen en su transformación a lo largo del metabolismo lipídico y en el cumplimiento de las diferentes actividades fisiológicas (Hsia, S., 2003; Schreier, L. y col., 2005).

Las HDL-colesterol son las lipoproteínas más densas y de menor tamaño, que cumplen un papel antiaterogénico. Vehiculizan el exceso de colesterol desde los tejidos hacia el hígado, para su posterior reciclaje o

catabolismo a ácidos biliares. Otras funciones de las HDL-colesterol se encuentran relacionadas con la inhibición de la oxidación de las LDL-colesterol en la pared arterial y la inhibición de la expresión de moléculas de adhesión endotelial (Von Eckardstein, A. y col., 2005), como así también, con otras funciones ateroprotectoras que incluyen actividades antioxidantes, antiinflamatorias, antitrombóticas y profibrinolíticas (Shah, K. y col., 2001). Como resultado de estas acciones, las HDL-colesterol, poseen el potencial de prevenir y también de corregir la disfunción endotelial, considerada como un factor clave en la patogenia de la aterosclerosis, mas allá de los valores de estas lipoproteínas (Posadas Romero, C., 2007).

Por otro lado, la función de las LDL-colesterol es la de distribuir el colesterol a los tejidos que lo requieran, para la reposición de los componentes de las membranas celulares o para la síntesis de hormonas esteroideas (Schreier, L. y col., 2005). Además, participan en la regulación de la biosíntesis del colesterol a través de su unión a receptores específicos y son susceptibles de sufrir modificaciones como consecuencia de la influencia del medio o de la genética. Estas lipoproteínas modificadas poseen mayor capacidad aterogénica que las nativas. La retención de las LDL-colesterol modificadas, en el subendotelio, activa una serie de señales proinflamatorias que culminan con una respuesta inflamatoria que va a desencadenar consecuentemente el proceso aterogénico (Greco, G. y col., 2009).

El colesterol total en sangre es un valor predictivo del riesgo de padecer varias enfermedades como la aterosclerosis, patologías cardíacas, problemas cerebrovasculares, diabetes y otros trastornos metabólicos. Si a este valor se lo relaciona con el valor de la HDL-colesterol, el resultado es un indicador más exacto de la probabilidad de padecer dichas enfermedades. Esta relación se denomina índice aterogénico de Castelli (Castelli W., 1984).

- Hipertensión

El origen de esta patología es multifactorial. Está fuertemente asociada con la obesidad y comunmente ocurre en individuos resistentes a la insulina

(Scott, M. y col., 2004). Este es un importante factor de riesgo de contraer enfermedades cardiovasculares (Cordero, A. y col., 2005).

- Diabetes Mellitus

Es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, resultante de la alteración de la acción de la insulina, de la secreción de la misma o ambas. La hiperglucemia crónica asociada a esta patología se asocia, a largo plazo, con la disfunción y la falla orgánica, especialmente a nivel de los ojos, los riñones, los nervios, el corazón y los vasos sanguíneos. También se manifiesta por la poliuria, la polidipsia, la pérdida de peso y ocasionalmente con polifagia. Los pacientes con diabetes mellitus, tienen mayor incidencia de aterosclerosis cardiovascular, arterial periférica y de enfermedad cerebrovascular. También se observan hipertensión y anomalías del metabolismo de las lipoproteínas (Civeira Murillo, F. y col., 2013).

- Resistencia a la Insulina

Es un fenómeno fisiopatológico en el cual se altera la acción biológica de la insulina en los diferentes tejidos, lo que provoca una hiperinsulinemia compensatoria. Cuando el organismo no puede mantener esta respuesta de hiperinsulinemia, se desarrolla la diabetes mellitus tipo 2. Pero en el caso contrario, si la hiperinsulinemia se sostiene, se desarrollan una serie de alteraciones, principalmente de tipo metabólico, que aumentan el riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares (Pineda, C., 2008; Ros Pérez, M. y Medina-Gómez, G., 2011).

- Intolerancia a la Glucosa

Se caracteriza por una respuesta anormal a una sobrecarga de glucosa suministrada por vía oral. Este estado se asocia a una mayor prevalencia de

patologías cardiovasculares y a un mayor riesgo de desarrollar diabetes clínica (Song, D. y col., 2007).

ESTRÉS OXIDATIVO

Un gran número de estudios en animales experimentales han demostrado que los factores de riesgo comunes para la aterosclerosis aumentan la producción de radicales libres de oxígeno, no sólo por parte de las células endoteliales sino también por las células musculares lisas y por las células vasculares adventicias (Cai, H. y col., 2000). Además, esta patología se considera una enfermedad inflamatoria crónica que se desarrolla como consecuencia del atrapamiento de las LDL-colesterol en la íntima arterial (Calmarza, P., 2008). Por lo tanto, la hipercolesterolemia, la diabetes, la hipertensión, el tabaquismo, el envejecimiento y la intolerancia a los nitratos, aumentan la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) e inician varios procesos implicados en la aterogénesis, incluyendo la expresión de moléculas de adhesión, la estimulación de la proliferación y la migración del músculo liso vascular, la apoptosis en el endotelio, la oxidación de los lípidos, la activación de metaloproteinasas de la matriz y alteración de la actividad vasomotora (Harrison, D. y col., 2003).

El concepto de *estrés oxidativo* fue propuesto por Sies, H. y Cadenas, E. en plena década del ochenta, como un desbalance en el que hay un aumento de oxidantes o una disminución de antioxidantes, en comparación con la situación definida como normal (Sies, H., 1985; Cadenas, E., 1989). Este concepto fue inspirado en la idea de estrés de Selye, H. instalada para el Síndrome General de Adaptación y en la idea de Gerschman de que tanto la hiperoxia como la disminución de antioxidantes llevan a un daño tisular (Boveris, A., 2005).

En la actualidad, al estrés oxidativo se lo define como, el desequilibrio bioquímico propiciado por la producción excesiva de ROS y RL, los cuales le provocan daño oxidativo a las biomoléculas y no puede ser contrarrestado por los sistemas antioxidantes (Harman, D., 1992).

Desde el punto de vista químico los RL son aquellas especies químicas, cargadas o no, que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera gran inestabilidad (Cap. Justo R. Venereo Gutiérrez, 2002, Sánchez-Rodríguez, M. y col., 2004). Debido a esto, son capaces de extraer un electrón de las moléculas vecinas para completar su orbital, convirtiéndose en componentes altamente reactivos y oxidantes (Halliwell, B., 1991; Halliwell, B. y Gutteridge, J., 1992; Chesseman, K.H. y Slater, T.F., 1993).

Dentro de las especies reactivas, las ROS son las formas parcialmente reducidas del oxígeno. Éstas se forman a partir de la reducción univalente del O_2 , generando reactivos intermediarios en una serie de reacciones que involucran cuatro electrones, produciendo tres compuestos ROS: el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) (Fig. 2) (Gutteridge J., 1994; Boveris, A., 2005; Halliwell, B. y Gutteridge, J., 2007; Cerdá Micó, C. y Sáez Tormo, G., 2009)

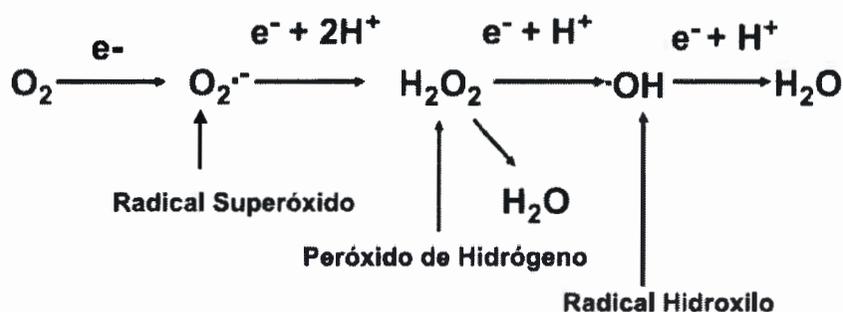
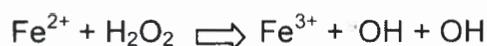


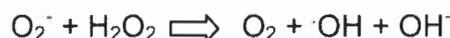
Fig. 2: Reducción univalente del O_2 .

El H_2O_2 no es un RL, pero cae en la categoría de ROS por ser un compuesto intermediario e importante en la bioquímica de los RL, ya que se descompone fácilmente en presencia de metales de transición (principalmente el Fe^{2+}) para producir el OH^{\cdot} (Chesseman, K.H. y Slater, T.F., 1993; Neurooz-Zedeh, J. y col., 1999; Boveris, A., 2005).

La formación del OH[·] transcurre a través de la reacción de Fenton:



y la óxido-reducción cíclica del metal por parte del superóxido:



El O₂⁻, el H₂O₂ y OH[·] reaccionan con relativa facilidad con macromoléculas claves para la correcta función celular, como lo son, los ácidos grasos de las estructuras fosfolipídicas, las proteínas, los hidratos de carbono y los ácidos nucleicos (Halliwell, B. y Gutteridge, J., 2007).

Además del O₂, el nitrógeno también es capaz de formar RL como dos óxidos: óxido nítrico (NO[·]) y dióxido nítrico (NO₂[·]), conformando las llamadas especies reactivas del nitrógeno (ERNs) (Knight, J., 1999; Dröge, W., 2002).

La formación de las ROS es el resultado del metabolismo natural de los seres aerobios, es decir, la formación de estas especies reactivas no es patológica en sí, más bien, es la formación excesiva de éstas lo que pone en peligro y puede dañar la estructura molecular de las células que consumen oxígeno. Por el contrario, en condiciones fisiológicas, bajo el control de los sistemas antioxidantes, a las ROS se les atribuye funciones de regulación metabólica y de expresión génica (Boveris, A., 2005).

Para poder detectar estos daños, se utilizan normalmente, indicadores químicos, mediante la determinación de los productos de reacción de radicales libres oxidativos con biomoléculas, como el malondialdehído (MDA) o sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), que son productos de la lipoperoxidación, la 8-OH-deoxiguanosina, producto de la oxidación de los ácidos nucleicos y los grupos carbonilos de proteínas oxidadas (Boveris, A., 2005).

El estrés oxidativo ha sido relacionado con diversos procesos fisiopatológicos que ocurren en el SM, tanto en su génesis como en el camino

del proceso aterogénico. El daño mediado por éste, se dirige fundamentalmente al ADN, las proteínas y los lípidos (González Sotolongo, O. y col., 2009). Dentro de estas fisiopatologías generales, encontramos la resistencia a la insulina, ya que se ha comprobado que el estrés oxidativo puede inducir a la misma, mediante la fosforilación de los receptores de la insulina (Maritim, A.C. y col., 2003; Li, L.F. y Li, J., 2007). Además, juega un papel importante a través de las citoquinas pro-inflamatorias, cuyos niveles se encuentran elevados en el SM (Wei, Y. y col., 2007). La activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona también está involucrado en la producción de estrés oxidativo y el consiguiente daño endotelial en el SM (Cooper, S.A., 2007).

Existen diversos trabajos que responsabilizan al estrés oxidativo de provocar importantes daños que ocurren en el SM, tales como la peroxidación lipídica, daño en las membranas celulares, daño del ADN, trastorno en la expresión de genes y disfunción endotelial (Ford, E.S. y col., 2003; Hansel, B. y col., 2004; Govindarajan, G. y col., 2006). También se lo relaciona con la obesidad, la hipoadiponectinemia y alteraciones cardíacas, endoteliales y renales (Stein, N. y col., 2007; Sarafidas, P.A. y col., 2007)

A partir de estos antecedentes se emitieron las siguientes hipótesis y objetivos

HIPÓTESIS

El estrés prenatal afecta la regulación de la glucemia, el metabolismo lipídico y parámetros del estrés oxidativo en ratas macho adultas.

OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto del estrés prenatal sobre la regulación la glucemia, parámetros del metabolismo lipídico y del estrés oxidativo; y su relación con la actividad del eje HHA en ratas macho adultas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En ratas macho adultas:

- Determinar los niveles plasmáticos de corticosterona.
- Determinar los niveles plasmáticos de la glucemia.
- Determinar los niveles plasmáticos de insulina.
- Determinar la tolerancia oral a la glucosa.
- Cuantificar los niveles plasmáticos de colesterol Total
- Cuantificar los niveles plasmáticos de HDL-colesterol.
- Cuantificar los niveles plasmáticos de LDL-colesterol
- Determinar los índices aterogénicos.
- Cuantificar los niveles plasmáticos de los triacilglicéridos.
- Determinar la concentración de MDA como indicador de peroxidación lipídica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de los animales de experimentación:

Se utilizaron ratas machos albinas (Wistar) de 90 días de edad, hijos de madres sometidas a estrés crónico por IMO (Michajlovskij, N., 1988), intermitente e impredecible durante 30 minutos diarios, tres veces por semana, durante las dos últimas semanas de preñez (EP) y sus controles no estresadas (CP). Todos los animales fueron mantenidos en condiciones estándar de bioterio (luz 7:30 a 19:30 hs. y temperatura 20 (\pm 2 °C)) y se les suministró agua y alimento "*ad libitum*". Luego del nacimiento se dejó 8 crías (machos y hembras) por madre, tanto para el grupo control como en el de crías estresadas prenatalmente.

De estos tratamientos surgieron los siguientes grupos: **CP y EP.**

CP: crías de madres no estresadas.

EP: crías de madres estresadas.

El destete fue realizado a los 21 días post-nacimiento. En ese momento se dejaron 4 machos por camada los cuales se alojaron juntos en la misma jaula (utilizando 2 de ellos en cada experimento para evitar el "efecto camada") (Chapman, R. H. y J. Stern. 1978).

Preñez

Las hembras fueron apareadas en jaulas grandes, en una proporción de tres hembras por macho, de 4 meses de edad y sexualmente maduros, con el propósito de obtener el mayor número de hembras preñadas.

Con el fin de determinar el momento preciso en que se produce el servicio de la hembra, todos los días por la mañana, entre las 9:00 y las 11:00 horas se realizó el ciclado. Para ello, a cada una de las hembras le fue extraído

material vaginal que se analizó al microscopio, a los fines de determinar la presencia de espermatozoides provenientes de la cópula del macho (ciclado). Las hembras que tenían espermatozoides en el exudado vaginal fueron separadas en jaulas individuales (se consideró como el día uno de preñez).

Estrés prenatal

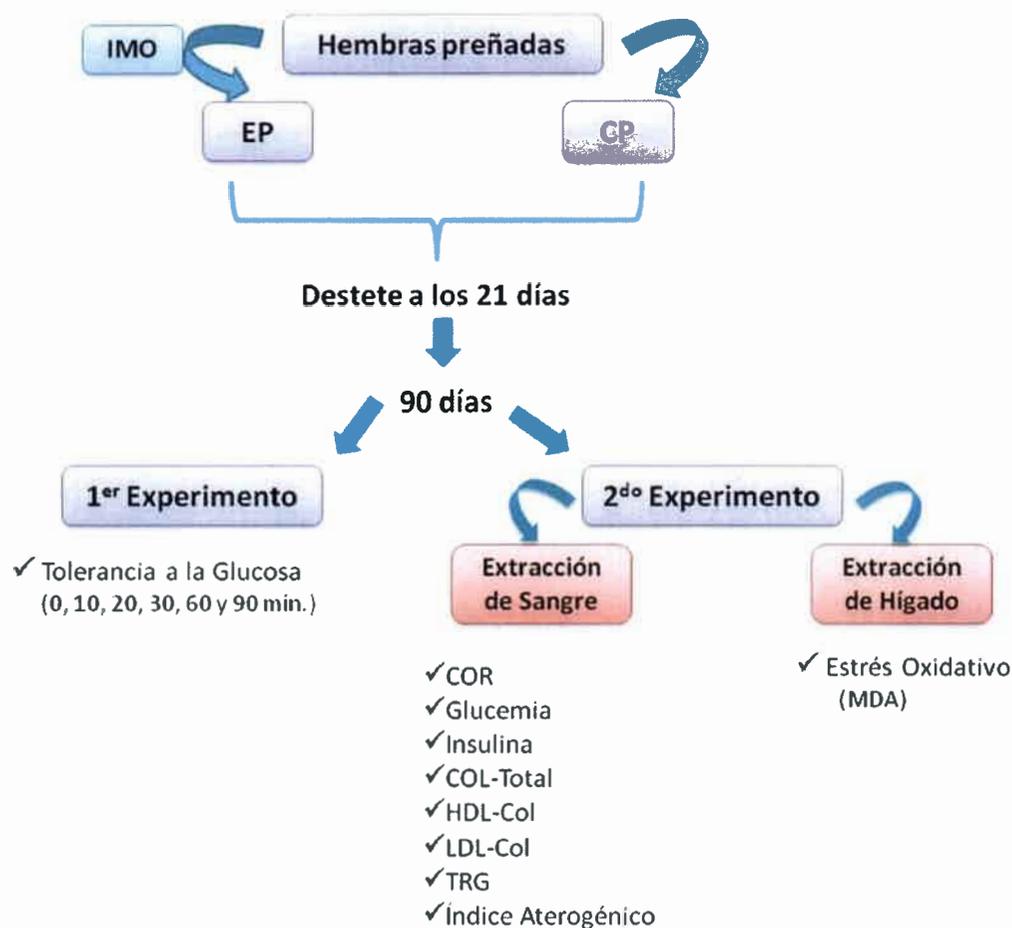
La sesión de estrés por IMO, se realizó en tablas de maderas de 20 x 20 cm., con cuatros soportes metálicos apoya-miembros en sus ángulos, donde se sujetaron las patas del animal con cinta hospitalaria.

Todas las sesiones de estrés se realizaron en forma intermitente e impredecible durante 30 minutos diarios, tres veces por semana, durante las dos últimas semanas de preñez, dentro de una habitación alejada del resto de los animales, evitando la situación de estrés para los mismos.



Fig. 3: Inmovilización en plancha

Diseño experimental



Primer Experimento

A los 90 días de edad, cuando alcanzaron la madurez sexual, un grupo de animales EP y sus controles CP, fueron sometidos a la prueba de tolerancia a la glucosa oral. Para ello, se obtuvieron muestras de sangre mediante una pequeña escisión en uno de los vasos sanguíneos de la cola, recolectándola por capilaridad en tubos heparinizados a diferentes tiempos, 0 (plasma basal) y a los 10, 20, 30, 60 y 90 min., luego de la administración de la solución de glucosa al 40 % vía oral (1 g/kg) con un ayuno de 12 hs (toda la noche). Los tubos se centrifugaron inmediatamente a 3000 rpm durante 15 min. y se separó el plasma para dicha determinación (Song, D. y col, 2004).

Segundo experimento

Un grupo de animales, se sacrificaron por decapitación y se extrajeron muestras de sangre que fueron colocadas en tubos con ácido etilendiaminotetracético (EDTA) para la obtención de plasma. Los tubos se centrifugaron inmediatamente a 3000 rpm durante 15 min. y se separó el plasma. Luego, se extrajo el hígado bajo condiciones de esterilidad, para determinar el estrés oxidativo y como indicadores de peroxidación lipídica se utilizó MDA. Ambos se conservaron a -20 °C, hasta el momento de la determinación.

Del plasma se realizaron las siguientes determinaciones:

- Niveles plasmáticos de corticosterona.
- Niveles plasmáticos de la glucosa.
- Niveles plasmáticos de insulina.
- Niveles plasmáticos de colesterol Total
- Niveles plasmáticos de HDL-colesterol.
- Niveles plasmáticos de LDL-colesterol
- Índices aterogénicos.
- Niveles plasmáticos de los triacilglicéridos

- Determinación de la COR por Radio inmunoensayo (RIA):

El fundamento de la técnica de RIA es la reacción entre una sustancia marcada radiactivamente y un anticuerpo obtenido contra la misma. En las técnicas normales de RIA la cantidad de sustancia marcada y la cantidad de anticuerpo que se pone a cada tubo es siempre la misma (excepto a los tubos totales y a los no específicos que no llevan anticuerpo y en su lugar contiene el mismo volumen de tampón).

El anticuerpo se pone bastante diluido de tal manera que solo ligue una parte de la sustancia marcada que se coloca. Si no hay sustancia patrón no-marcada (fría) el tubo se denomina "cero" y representa el máximo de unión de la sustancia marcada con el anticuerpo. A medida que aumenta la cantidad de la sustancia patrón, se detecta menor nivel de radioactividad ligada al anticuerpo, debido a que el patrón compite con la sustancia marcada y por lo tanto esta se liga cada vez en menor medida (se obtiene así una curva de desplazamiento de la sustancia marcada ligada al anticuerpo).

La relación entre la concentración del patrón y el desplazamiento no es lineal y por eso en el RIA se utiliza una transformación logit/log que linealiza la relación.

La puesta a punto de una técnica de RIA implica el disponer de una hormona marcada radiactivamente, un anticuerpo generado contra esa hormona y una hormona que sirve como estándar. Cuando se dispone de estos reactivos se han de encontrar las concentraciones óptimas para el RIA, que se pueden resumir en las siguientes:

- (1) Tampón de composición y pH definidos.
- (2) Concentraciones óptimas de la hormona marcada y del primer anticuerpo.
- (3) Tiempo, temperatura y método de incubación.
- (4) Método de separación de la hormona libre y de la ligada al anticuerpo.

La determinación de la COR plasmática por RIA se hizo mediante una técnica que hemos estandarizado en nuestro laboratorio, en la que usamos COR 3H* (Sigma) y un anticuerpo específico de COR de rata (Tecnolab). La sensibilidad de este ensayo fue de 10 pg of COR y los coeficientes de variabilidad inter e intra-ensayo fueron < 10%.



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 °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 hija 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) cuya concentración es de 25 pg/ul. En los tubos correspondientes a la curva patrón, se colocaron 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 contuvieron 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 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, tampón o muestra
- 200 µl de tampón, 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 hs.

Tubos	Tampón	Standard ó Muestra	Agitar, y	COR-H ³	Antisuero	Agitar y Luego
NSB	210 ul	–	luego a	100 ul	–	4°C 18-24 hs.
NSB	210 ul	–	70°C	"	–	
B ₀	210 ul	–	30 min.	"	100 ul	
B ₀	210 ul	–	enfriar	"	"	
St 1	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 Glucosa

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 H₂O₂ 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**

- Determinación de la Insulina

Mercodia Ultrasensitive Insulin ELISA es un inmunoensayo de fase sólida de los puntos. Se basa en la técnica de sándwich directo debido a la que dos anticuerpos monoclonales se dirigen contra determinantes antigénicos separados de la molécula de insulina. Durante la incubación, la insulina de la muestra reacciona con los anticuerpos anti-insulina conjugados en peroxidasa y anticuerpos anti-insulina ligados con los pocillos de microtitulación. El anticuerpo marcado con enzima no unido se elimina con un simple lavado. El Enzyme Conjugate unido se detecta por reacción con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB). La reacción se detiene añadiendo ácido para dar un punto final colorimétrico que se detecta por espectrofotometría.

Material requerido

- Pipetas de 25, 50, 200 y 1000 μ L (para la adición de la disolución enzyme conjugate 1X, Substrate TMB y Stop Solution se prefieren las pipetas de repetición).
- Cubetas y probetas para preparar los reactivos.
- Agua bidestilada.
- Lector de microplacas (filtro de 450 nm).
- Agitador de placas (La velocidad recomendable es de 700-900 vueltas por minuto, movimiento orbital).
- Lavador de microplaca.

Reactivos

Cada kit de Mercodia Ultrasensitive Insulin ELISA contiene reactivos para 96 pocillos, suficientes para 42 muestra y una curva de calibración por duplicado. Para series de ensayos mas amplias, mezclar reactivos de paquetes de numero de lote idéntico. La fecha de caducidad del kit completo esta en el exterior identificada en una etiqueta. La temperatura de conservación recomendada es 2–8 °C.

Placa Recubierta Anticuerpo monoclonal de ratón anti-insulina. Para cintas de microtitración sin utilizar, cerrar la bolsa con cinta adhesiva y conservar a 2-8°C durante 8	1 placa	96 pocillos 8 tiras de pocillos	Listo para usar
Calibradores 1, 2, 3, 4, 5 Insulina humana recombinante Codificado en amarillo Concentración indicada la etiqueta del vial.	5 viales	1000µL	Listo para usar
Calibrador 0 Codificado en amarillo	1 vial	5 ml	Listo para usar
Conjugado Enzimático 11X Monoclonal de ratón Conjugado enzimático con peroxidasa anti-insulina	1 vial	1.2 ml	Preparación, ver abajo
Buffer de Conjugado Enzimático Codificado en azul	1 vial	12 ml	Listo para usar
Lavado con buffer 21X Conservar después de la dilución; 2-8°C durante 8 semanas.	1 botella	50 ml	Diluir con 1000 ml de agua bidestilada para hacer de solución de lavado de buffer 1X
Substrato TMB Solución incolora <i>Atención! Es sensible a la luz!</i>	1 botella	22 ml	Listo para usar
Solución de Parada 0.5 M H ₂ SO ₄	1 vial	7 ml	Listo para usar

Preparación de la disolución del conjugado enzimático 1X

Preparar el volumen necesario disolución del conjugado enzimático 1X por dilución del conjugado enzimático 11X (1+10) en el buffer del conjugado enzimático según la siguiente tabla. Si se usa toda la placa, verter completamente el tampón buffer del conjugado enzimático al vial del conjugado enzimático 11X. Mezclar suavemente. Utilizar en un día.

Número de tiras	Conjugado Enzimático 11X	Buffer de Conjugado Enzimático
12 tiras	1 vial	1 vial
8 tiras	700 µL	7.0 mL
4 tiras	350 µL	3.5 mL

Obtención y manipulación de muestras

Suero

Recoger la sangre por venipunción, dejar coagular y separar el suero por centrifugación. Las muestras pueden conservarse a 2–8 °C hasta 24 horas. Para periodos más largos, conservar las muestras a –20 °C. Evitar la congelación y descongelación de forma repetida.

Plasma

Recoger la sangre por venipunción en tubos que contienen heparina o EDTA como anticoagulante y separar la fracción de plasma. Las muestras pueden conservarse a 2- 8 °C hasta 24 horas.

Para periodos más largos, conservar las muestras a –20 °C. Evitar la congelación y descongelación de forma repetida.

Preparación de las muestras

Normalmente no es necesario diluirlas; sin embargo, las muestras que contienen >20 mU/L deben diluirse 1/10 v/v con el calibrador 0.

Procedimiento de evaluación

Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente antes de su uso. Preparar una curva calibración para cada ensayo.

1. Preparar solución de conjugado enzimático 1X y solución con lavado de buffer 1X.
2. Preparar suficientes pocillos de microplaca para los calibradores y muestras por duplicado.
3. Pipetear 25 µL de cada calibrador y muestra en los pocillos correspondientes.

4. Anadir 100 μ L solución de la conjugado enzimático 1X a cada pocillo.
5. Incubar en un agitador de placas (700-900 rpm) durante 1 hora a temperatura ambiente (18–25°C).
6. Lavar 6 veces con 700 μ L solución de lavado con buffer 1X por pocillo mediante Lavador de placas automático con función de sobre-flujo de lavado. Después del lavado final, invertir la placa y golpearla firmemente contra papel absorbente. No usar el paso de remojo durante el proceso.

O manualmente: Verter el líquido invirtiendo la microplaca en una pila. Anadir 350 μ L de solución de lavado con buffer 1X, golpeando firmemente la placa contra papel absorbente para eliminar todo el líquido en exceso. Repetir 5 veces. Evitar remojo prolongado durante el proceso
7. Anadir 200 μ L de sustrato TMB.
8. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente (18–25°C).
9. Anadir 50 μ L de la solución de parada a cada pocillo.

Colocar la placa en un agitador durante aproximadamente 5 segundos para asegurar el mezclado.

10. Leer la densidad óptica a 450 nm y calcular los resultados. Leer en 30 minutos.

Aviso: Usar pipetas distintas para prevenir contaminación entre conjugado y sustrato.

Cálculo de resultados

Cálculo computarizado

Para obtener la concentración de insulina realice la reducción de datos computarizados de la absorbancia para los calibradores, sin calibrador 0, frente a la concentración utilizando un análisis de regresión según lo indica el kit.

Cálculo manual

1. Representar gráficamente los valores de absorbancia obtenidos para los calibradores, sin calibrador 0, frente a la concentración de insulina en papel log-log y construir una curva de calibración.
2. Leer la concentración de las muestras a partir de la curva de calibración.

- Determinación del Colesterol Total

La determinación del colesterol se realizó por un método enzimático. Se utilizó el kit comercial Colestat enzimático AA, provisto por Laboratorio Wiener.

Los esteres de colesterol son hidrolizados por la enzima colesterol esterasa a colesterol y ácidos grasos libres, este colesterol más el originariamente presente es oxidado enzimáticamente por la colesterol oxidasa, se origina peróxido de hidrógeno que se combina con HBA y 4- aminoantipirina para formar un cromóforo, el colorante quinoneimina, que es cuantificado a 500nm (Allain, D., 1974; Young, D.S., 2001).

Se utilizaron muestras de plasma extraído con EDTA. Luego de ser procesada la muestra una concentración estandarizada, se leyeron en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero con el Blanco.

Procedimiento:

En tres tubos o cubetas espectrofotométricas marcadas B (Blanco), S (Standar) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Standard	-	10 ul	-
Muestra	-	-	10 ul
Reactivo de Trabajo	1 ml	1 ml	1ml

Incubar 5 min en baño de agua a 37°C o 20 min a temperatura ambiente (25°C)

Los resultados se calcularon según la fórmula:

$$\text{Colesterol (g/L)} = D \times f \quad f = \frac{2,00 \text{ (g/L)}}{S}$$

- Determinación del HDL-Colesterol

Se utilizó el kit comercial HDL-colesterol FT, provisto por Laboratorio Wiener. Las HDL-colesterol se separaron precipitando selectivamente las lipoproteínas de baja densidad y muy baja densidad (VLDL) mediante el agregado de ácido fosfotungsténico en presencia de iones magnesio. Las HDL-colesterol quedan en el sobrenadante separadas por centrifugación, donde se realiza la determinación del colesterol ligado a las mismas, empleando el método enzimático Colesterol oxidasa/Peroxidasa con colorimetría (Youg, D.S., 1990; Expert Panel, JAMA, 2001). La determinación se realizó en plasma, las muestras permanecieron refrigeradas desde su extracción hasta el procesamiento. Se leyó a 505 nm en espectrofotómetro.

Procedimiento:

En un tubo de extracción medir 0,5 ml (500 ul) de muestra y agregar 50 ul de Reactivo Precipitante. Homogeneizar agitando (sin invertir) durante 20 seg. y dejar 30-40 min. en el refrigerador (4-10 °C) ó 15 min. en baño de agua a la misma temperatura. No colocar en el congelador. Centrifugar 15 min. a 3000 rpm. Usar el sobrenadante límpido como muestra.

En tres tubos de fotocolorímetro marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Sobrenadante	-	-	100 ul
Standard	-	20 ul	-
Rvo. de Trabajo	2 ml	2 ml	2ml
Colestat enzimático			

Mezclar e incubar 15 min. a 37 °C. Retirar del baño y enfriar.

La concentración de HDL-colesterol en la muestra se calculó de la siguiente manera:

$$HDL\text{-colesterol (g / L)} = D \times f \quad f = \frac{0,762}{S}$$

- Determinación del LDL-Colesterol

Se utilizó el kit comercial LDL-colesterol del Laboratorio Wiener. El ensayo LDL-colesterol fue utilizado para la cuantificación de colesterol de lipoproteína de baja densidad en plasma. Se emplearon dos reactivos, el reactivo I que contiene un agente tensioactivo que solubiliza únicamente las partículas de lipoproteína que no son del tipo LDL-colesterol. El colesterol liberado es consumido por la enzima colesterol esterasa y la colesterol oxidasa en una reacción que no forma color. El reactivo II con otro agente tensioactivo solubiliza las partículas LDL-colesterol restantes y un acoplador cromogénico N, N-Bis-4-sulfobutil-m-toluidina, disódica/DSBMT/ permite la formación de color. La reacción enzimática con LDL-colesterol en presencia del acoplador produce color que es proporcional a la cantidad de LDL-colesterol presente en la muestra. (Seidel D, 1982; Young, 1990; Expert Panel, JAMA, 2001).

Las muestras permanecieron refrigeradas desde su extracción hasta su procesamiento. En un tubo se midió 200 µl de muestra, se agregó 100 µl de

reactivo precipitante y se dejó reposar 15 minutos en baño a 20-25° C. Luego, se centrifugó 15 minutos a 3000 rpm. Se usó el sobrenadante para el ensayo colorimétrico.

Procedimiento:

En tres tubos de fotocolorímetro marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Sobrenadante	-	-	100 ul
Standard	-	20 ul	-
Rvo. de Trabajo	2 ml	2 ml	2ml

Mezclar e incubar 15 min. a 37 °C. Retirar del baño y enfriar. Leer en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero de absorbancia con el blanco.

La concentración de LDL-colesterol en la muestra se calculó con la siguiente fórmula:

$$LDL\text{-colesterol (g / L)} = \text{Colesterol total} - (D.f) \quad f = \frac{0,624}{S}$$

- Índice Aterogénico

Se calcula mediante la relación: Colesterol total / HDL-colesterol. Esta relación es un indicador del riesgo de sufrir arterioesclerosis, diabetes, otros trastornos metabólicos y enfermedades cardiacas y/o cerebrovasculares.

- Determinación de los Triacilglicéridos

Se utilizó el kit comercial TAG Color GPO/PAP AA, provisto por Laboratorio Wiener. La técnica se fundamenta en la propiedad de los triglicéridos de ser hidrolizados por la lipasa a ácidos grasos libres y glicerol. El glicerol es fosforilado por el adenosina de trifosfato (ATP) mediante la glicerol quinasa para producir glicerol-3-fosfato y el adenosina difosfato (ADP). El glicerol-3-fosfato se oxida a fosfato dihidroxiacetona (DAP) mediante la glicerol fosfato oxidasa produciendo H_2O_2 , una reacción de color catalizada por peroxidasa, el H_2O_2 reacciona con 4-aminoantipirina (4-AAP) y 4-clorofenol (4-CP) para producir un color rojo. La absorción de este color es proporcional a la concentración de triglicéridos presente en la muestra. El reactivo está basado en el método de Wako y las modificaciones de Mc. Gowan (Fossati, 1982; Young, 1990). Se utilizaron muestras de plasma extraído con EDTA.

Procedimiento:

Homogeneizar la muestra antes de utilizarla.

En tres tubos de fotocolorímetro marcados B (Blanco), S (Standard) y D (Desconocido) colocar:

	B	S	D
Muestra	-	-	20 ul
Standard	-	20 ul	-
Rvo. de Trabajo	2 ml	2 ml	2ml

Mezclar e incubar 15 min. a 37 °C ó 20 min. a temperatura ambiente (18-25°C). Retirar del baño y enfriar. Leer en espectrofotómetro a 505 nm, llevando el aparato a cero de absorbancia con el blanco.

Se procesó según el instructivo y se procedió a leer en espectrofotómetro a 505 nm.

El cálculo de los resultados se hizo aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Triacilglicéridos (g / L)} = D \times f \quad f = \frac{2,00 \text{ (g/L)}}{S}$$

- Determinación de la concentración de MDA

Como marcador de la peroxidación lipídica, se determinó la concentración de MDA en homogenato de hígado, por medio de la técnica de TBARS. Esta variable fue medida utilizando el método original de Buege y Aust (1978) modificado para tejidos por Marcincak y col, 2003.

a) Procedimiento -Muestras de animales experimentales.

La técnica consiste en colocar 600 ul al 30% (p/v) de homogenato de hígado mezclado con butilhidroxitolueno (BHT) como antioxidante y ácido tricloroacético al 15 %, se agitó e incubó a 90° C durante 30 minutos. Luego del enfriado y centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos, 600 ul del sobrenadante se extrajeron y se pusieron reaccionar con un volumen igual de ácido clorhídrico 0,25 N y tiobarbitúrico (TBA) 0,375 %. La mezcla de reacción fue nuevamente incubada a 90° C durante 30 min., extraída del baño y enfriada, posteriormente, se puso reaccionar con dos volúmenes de butanol, se centrifugó y la capa coloreada fue medida a 535 nm usando 1,1,3,3-tetraethoxypropano (Sigma) como el estándar.

Método:

- 1) Pesar 1 gr de tejido (mantener en hielo). Usar papel de aluminio rotulado.
- 2) Homogenizar el tejido con 3 ml de Buffer Fosfato (siempre en hielo).

3) Colocar en el primer juego de tubos.

Tubos	Buffer	BHT	H₂O bd	TCA	Homogenato
Bco.	600 ul	60 ul	20 ul	600 ul	
Bco-	600 ul	60 ul	20 ul	600 ul	
M ₁		60 ul	20 ul	600 ul	600 ul
M ₁		60 ul	20 ul	600 ul	600 ul

- 4) Tapar los tubos con tapa con agujeros.
- 5) Incubar 30 min. a 90°C: colocar peso arriba de las tapas y otra debajo de la grilla y atar.
- 6) Centrifugar 10 min. a 2500 rpm.
- 7) Extraer 600 ul de sobrenadante y colocar el segundo juegos de tubos.
- 8) Agregar 600 ul de HCL 0,25 N a cada uno.
- 9) Agregar 600 ul de TBA.
- 10) Tapar los tubos con tapa con agujeros.
- 11) Vortear.
- 12) Incubar 30 min. a 90°C.
- 13) Colocar en hielo.
- 14) Agregar a cada tubo 1800 ul de Butanol (bajo campana, con barbijo y propipeta con guantes).
- 15) Tapar los tubos con tapa sin agujeros.
- 16) Vorterear 20 seg.
- 17) Centrifugar a 10 min a 2500 rpm.
- 18) Separa el sobrenadante fucsia con pipeta y colocar en una cubeta rotulada (todo bajo campana), tapar la cubeta con tapa sin agujeros.
- 19) Leer en el espectrofotómetro a 535 nm.

Una vez obtenidas las lecturas colorimétricas correspondiente a cada una de las muestras de homogenato de hígado, se calcula la concentración de MDA utilizando la fórmula que relaciona lecturas colorimétricas (A) con

concentraciones de MDA conocidas (B), en una regresión de Potencia, según la fórmula:

$\text{Log } y \text{ (densidad)} = \text{Log } A + \text{Log } B \cdot x \text{ (concentración de MDA)}$.

$$X = \frac{\text{Log}^{-1} (\text{Log } y - \text{Log } A)}{B}$$

Las concentraciones de MDA fueron calculadas como nmol/ gr de tejido.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron estadísticamente por medio del programa estadístico STATISTICA. Las comparaciones se realizaron por un Análisis de Multivarianza (MANOVA) en el primer experimento y Análisis de la varianza (ANOVA) en el segundo experimento. Como test a posteriori se usó el test de Duncan cuando fueron apropiadas las comparaciones post-hoc. Se consideraron diferencias significativas con un $p < 0,05$.

RESULTADOS

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE CORTICOSTERONA EN CRÍAS MACHO

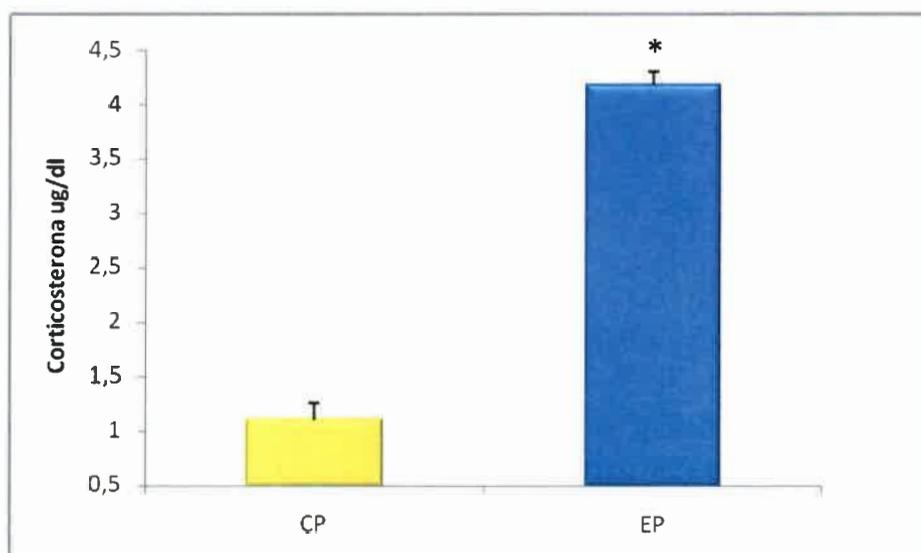


Fig. 4. Niveles de la corticosterona plasmática (ug/dl) en las crías macho adultas EP y CP en condiciones basales, EP (n = 9) CP (n = 7). Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0,05$ entre EP y CP.

Se usó un ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (Estrés prenatal). La corticosterona plasmática mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F(1,8) = 253.65; p < 0.0001$). Las diferencias significativas se indican con un $p < 0,05$, entre EP y CP.

Los niveles plasmáticos de COR que encontramos en el grupo EP son significativamente mayores que los de su grupo control.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE GLUCEMIA EN CRÍAS MACHO

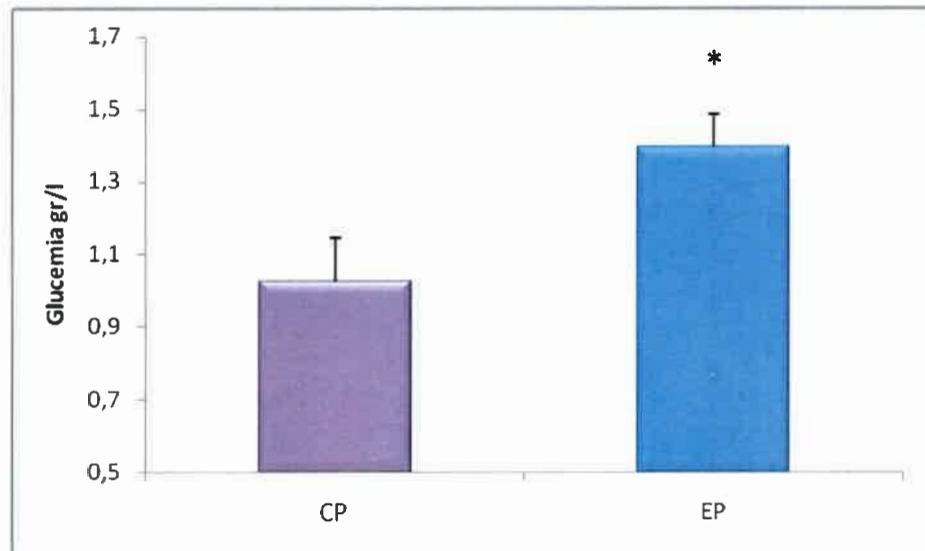


Fig. 5. Los niveles plasmáticos de Glucemia (g/l) en las crías macho adultas EP y CP en condiciones basales EP (n=12), CP (n = 7). Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0.05$ entre EP y CP.

Se usó ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (Estrés prenatal). La glucemia plasmática mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F(1,17) = 6.234330$; $p = 0.023096$).

El EP aumenta significativamente los niveles plasmáticos de glucosa en las crías adultas, en relación con los CP.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE INSULINA EN CRÍAS MACHOS

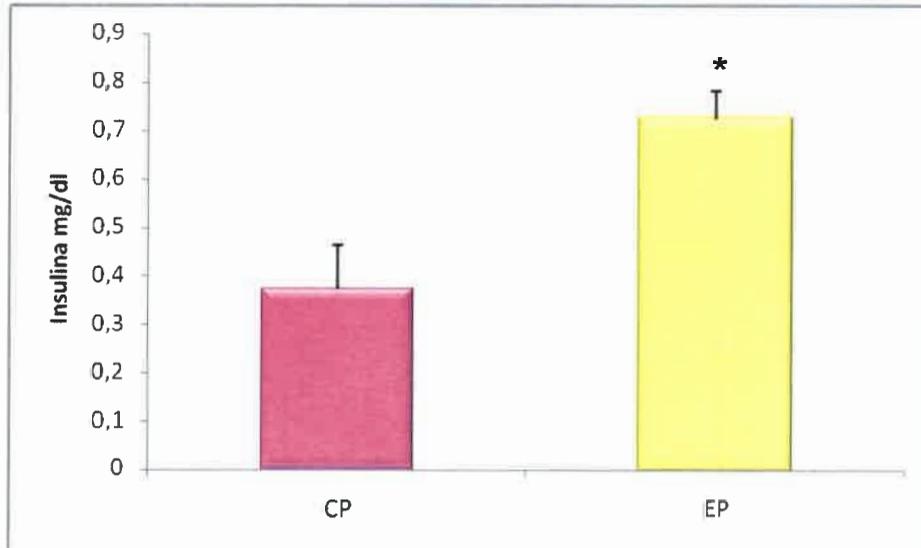


Fig 6: Los niveles plasmáticos de insulina (mg/dl) en las crías macho adultas EP y CP en condiciones basales EP (n = 12) CP (n = 5). Cada barra representa la media \pm S. E. M. *p < 0.05 entre EP y CP.

Se usó un ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (Estrés prenatal). La insulina plasmática mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F(1,15) = 11.08752$; $p = 0.004571$)

Los animales EP mostraron niveles plasmáticos de insulina incrementados.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA TOLERANCIA A LA GLUCOSA EN CRÍAS MACHO

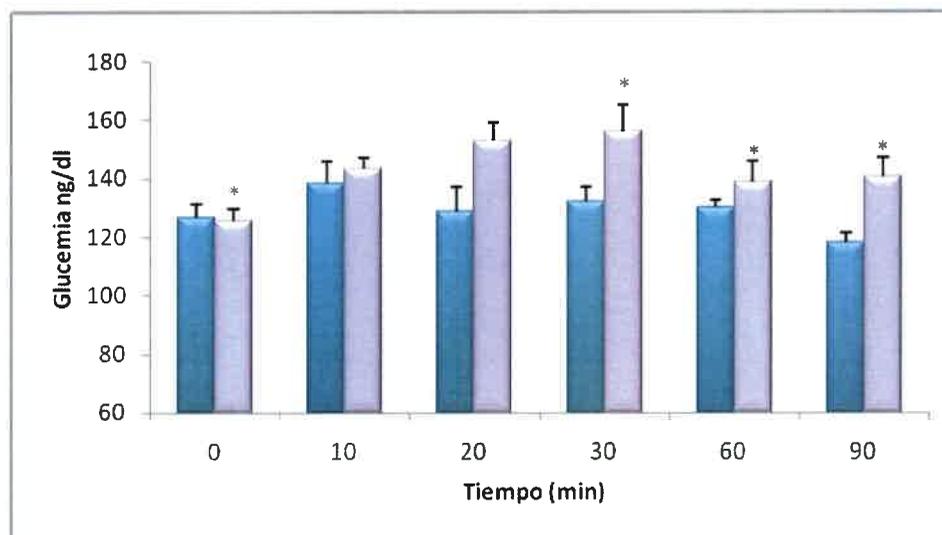


Fig 7: Se comparan los valores de tolerancia oral a la glucosa en distintos tiempos en ratas macho EP (n=5), los cuales fueron significativamente mayores que los CP (n =5) Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0.05$ entre EP y CP.

Se uso un MANOVA de medidas repetidas de dos vías mostró los efectos del tratamiento oral de glucosa ($F(1,8) = 722,01$ $p < 0,080932$) y del tiempo ($F(5,40) = 6,514845$; $p = 0,000162$). La interacción fue significativa entre ambos factores ($F(5,40) = 3,828083$; $p = 0,0062944$).

Nuestros resultados muestran que en condiciones basales los animales EP poseen un nivel plasmático de glucemia significativamente mayor que los animales CP.

Luego de la aplicación de la glucosa oral, se puede observar que a los 30, 60 y 90 min. los niveles plasmáticos de glucemia siguen siendo significativamente mayores en los animales EP en comparación con los animales CP.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE COLESTEROL TOTAL EN CRÍAS MACHO

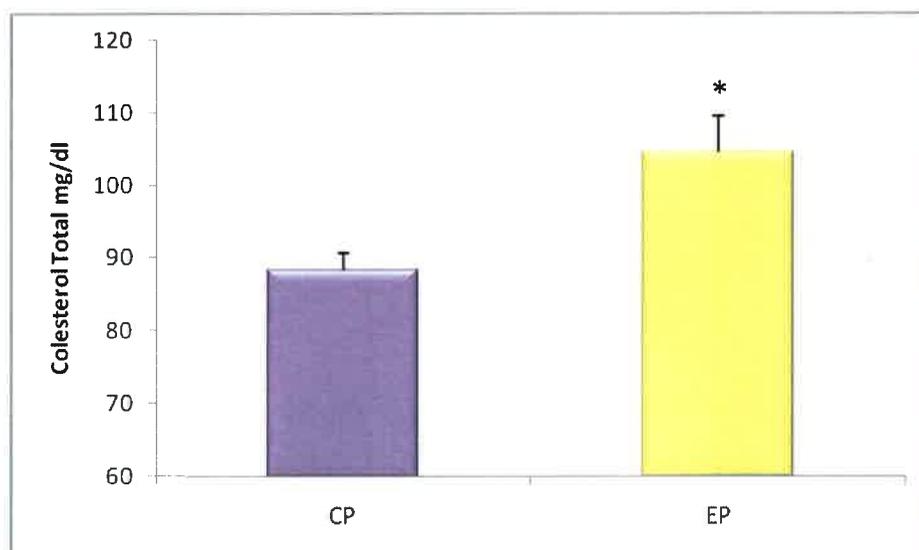


Fig. 8. Concentración plasmática de colesterol total en las crías macho adultas EP (n=8) y CP (n = 5). Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0.05$ entre EP y CP.

Se usó un ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (Estrés prenatal). El colesterol total plasmático mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F(1, 12) = 13.19418$; $p < 0.003436$).

Los animales EP mostraron un aumento significativo de los niveles plasmáticos de colesterol total.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE HDL-COLESTEROL EN CRÍAS MACHO

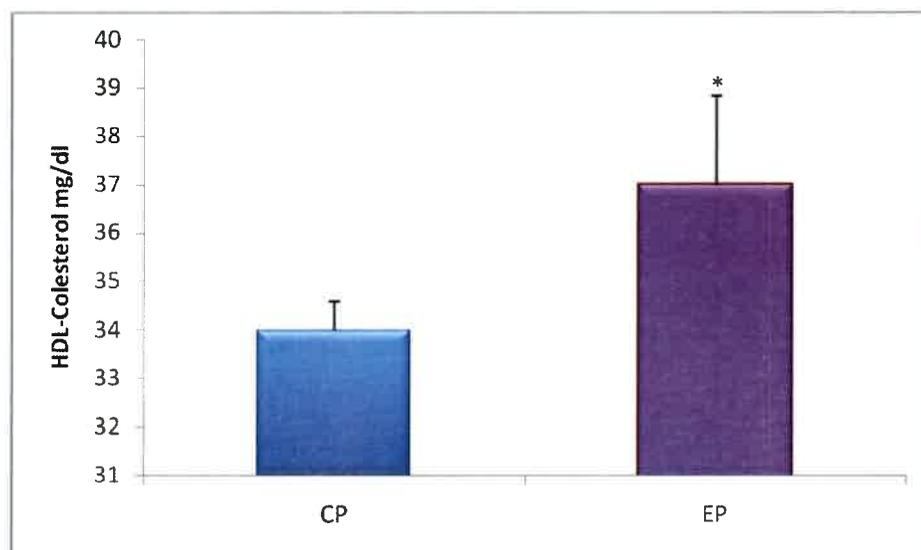


Fig. 9. Concentración plasmática de HDL-colesterol en las crías macho adultas EP (n= 8) y CP (n = 5). Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0.05$ entre EP y CP.

Se usó un ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (Estrés prenatal). El HDL- colesterol plasmático mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F(1, 12) = 15.4285; p < 0.002006$).

Como se puede observar el tratamiento EP aumenta diferencias significativas sobre los niveles plasmáticos de HDL- colesterol en relación a los animales CP.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE LDL-COLESTEROL EN CRÍAS MACHO

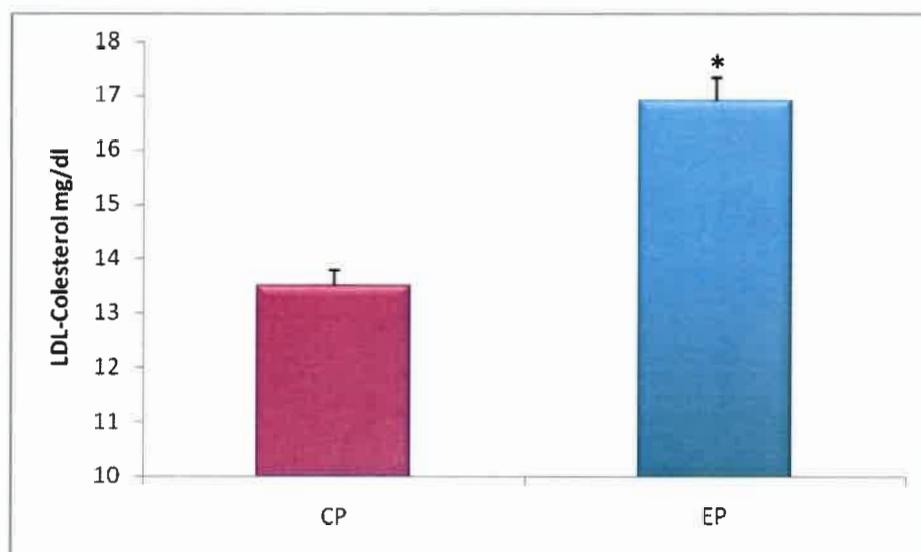


Fig. 10. Concentración plasmática de LDL-colesterol en las crías macho adultas EP ($n = 8$) y CP ($n = 5$). Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0.05$ entre EP y CP.

Se usó un ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (Estrés prenatal). El LDL-colesterol plasmático mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F(1, 12) = 43.52129$; $p < 0.000025$).

Se encontró que aquellos animales que recibieron EP, mostraron un aumento significativo en los niveles plasmáticos de LDL-colesterol.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE EL ÍNDICE ATEROGÉNICO EN CRÍAS MACHO

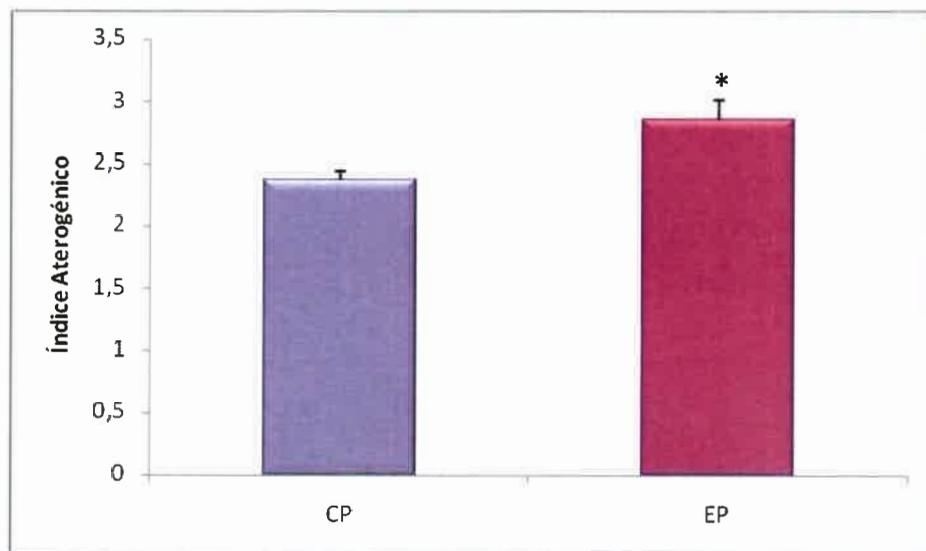


Fig 11: Índice aterogénico de ratas macho EP y CP. EP (n = 8) CP (n = 6). Hubo diferencias significativas con respecto a los CP. Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0.05$ entre EP y CP.

Se usó un ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (Estrés prenatal). El Índice aterogénico plasmático (Col Total/ HDL-colesterol) mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F(1, 12) = 5.9465$; $p < 0.031240$).

Como se puede observar el índice aterogénico plasmático mostró diferencias significativas entre los animales EP y CP.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE TRIACILGLICÉRIDOS EN CRÍAS MACHO

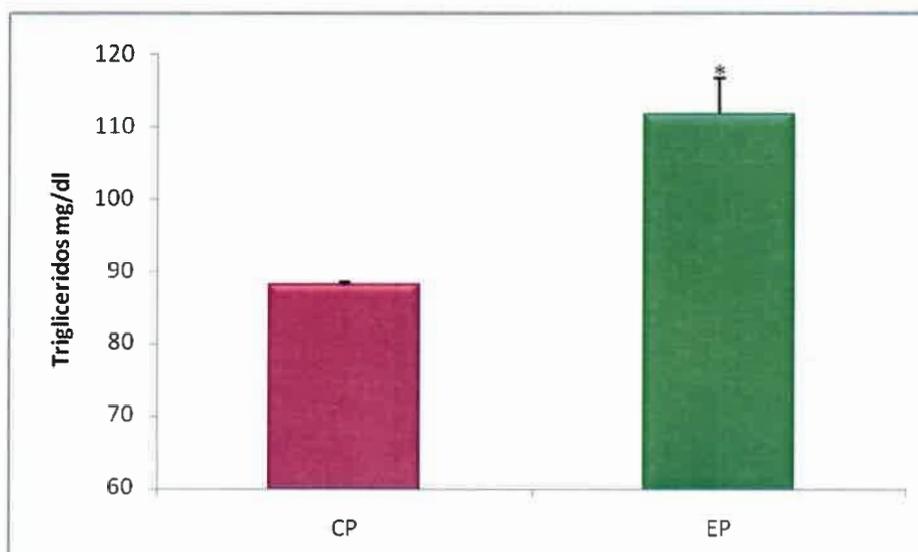


Fig. 12. Concentración plasmática de triacilglicéridos en las crías macho adultas EP ($n = 8$) y CP ($n = 5$). Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0.05$ entre EP y CP.

Se usó un ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (Estrés prenatal). Los triacilglicéridos plasmáticos mostraron un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F(1, 12) = 8.526126$; $p < 0.012841$).

Los niveles plasmáticos de triacilglicéridos en los animales EP mostraron diferencias significativas en relación con los CP.

EFFECTO DEL ESTRÉS PRENATAL SOBRE LA CONCENTRACIÓN DE MDA EN CRÍAS MACHO

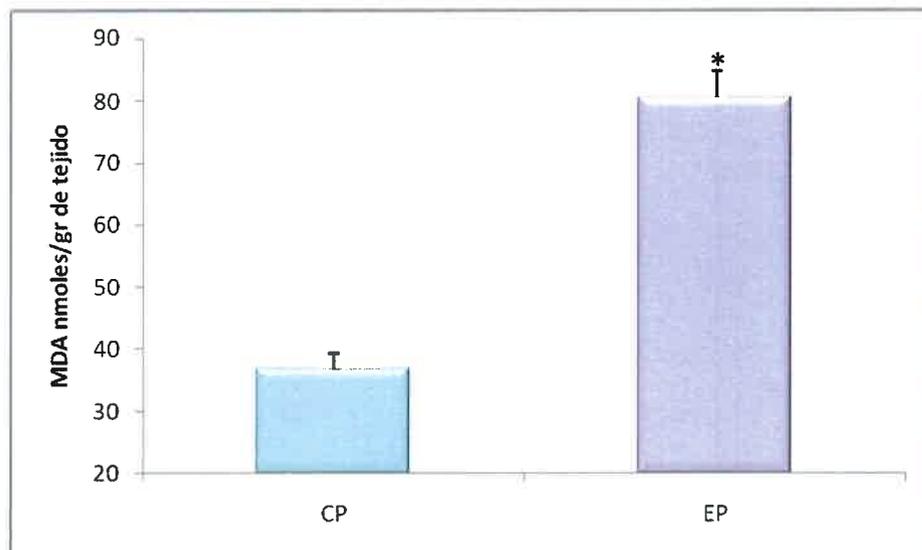


Fig. 13. Concentración de MDA en las crías macho adultas EP (n= 8) y CP (n = 6). Cada barra representa la media \pm S. E. M. * $p < 0.05$ entre EP y CP.

Se usó un ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (Estrés prenatal). El MDA mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ($F (1,12) = 66.09457; p < 0.00003$).

El EP, como se puede observar, aumenta significativamente la concentración de MDA en comparación con los animales CP.

DISCUSIÓN

Existen principalmente dos situaciones, entre otros, que propician la aparición de las patologías del SM en individuos adultos. Ellas son, la malnutrición y la programación del eje HHA. Dicha programación del eje, se realiza sometiendo al organismo inmaduro a un exceso de GC o a una condición que provoca el mismo efecto, lo cual causa la disminución de los GR en el hipocampo. Esto sugiere que la programación del eje HHA por diversas causas, en períodos de inmadurez, podría ser un denominador común subyacente como disparador de las patologías del SM.

El eje HHA, uno de los más representativos en la respuesta al estrés, desempeña un papel fundamental. En este sentido hemos encontrado que los niveles plasmáticos de COR están aumentados en los animales EP. Esto indicaría una hiperactividad del eje HHA producida por el estrés prenatal, coincidiendo estos resultados con los hallazgos de Clarke, A. y col. (1994) y Mayer, N. y col., (2011). La COR, es un GC liposoluble, por lo cual atraviesa rápidamente la placenta, impregnando los tejidos y órganos del feto. Como consecuencia de ello, tiene efectos importantes a largo plazo sobre las crías, afectando la correcta función de diferentes sistemas y procesos, como el metabolismo y las funciones cardiovasculares, entre otros. Estos efectos pueden observarse aún en la cría adulta (Pascual-Leone, A.M., 2007). Distintos autores muestran que esta hiperactividad del eje HHA podría haber sido generada por la disminución del número de receptores de mineralocorticoides (RM) presentes en el hipocampo de las crías (Maccari, S. y col., 1995; Barbazanges, A. y col., 1996; Maccari, S. y col., 2003). Los RM son generalmente los principales sustratos del control por retroalimentación negativa, de la secreción de GC adrenales bajo condiciones basales (De Kloet, E. y Reul, J., 1987). Este podría ser un mecanismo por el cual, los niveles plasmáticos de COR están incrementado en las crías EP, en nuestro estudio

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).

Como ya hemos dicho, numerosos investigadores sostienen que cuando se evalúa la influencia de un estresor particular sobre la respuesta del organismo, deben tenerse en consideración varios factores, como la naturaleza del agente utilizado (físico, psicológico o mixto), la severidad con la que se aplica el mismo (leve, moderado o intenso), la duración de la exposición diaria al estresor (continuo o intermitente), además de la posibilidad que tiene el animal de predecir el estímulo y de escapar del mismo (Pitman, D. y col., 1995; Martí, O. y Armario, A., 1998, Dickerson, S. y Kemeny, M., 2004). Teniendo en cuenta estas características, si bien, en nuestros experimentos se aplicaron a las madres solo 6 sesiones de IMO de 30 min. cada una, este resulta un estrés intenso, como lo demuestra el aumento de la COR plasmática basal. La intensidad de este estrés está asociada, en gran parte, a la impredecibilidad e inescapabilidad del mismo.

Sumado a esto, en trabajos previos de nuestro laboratorio, hemos comprobado que el EP produce bajo peso de las crías al nacer (Rodríguez, N. y col., 2007), lo cual predispondría, según numerosos estudios realizados por diversos autores (Kemppain, R. y Behrend, E., 1997; Armario, A., 1998; Bensi, M., 1999; Dickerson, S. y Kemery, M., 2004; Senturk y col., 2005), a sufrir los síntomas del SM. Como ejemplo de esto, en diversos estudios realizados en ratones alimentados con fructuosa, para provocar el SM, se encontró incrementada la ingesta calórica, con el desarrollo de la resistencia a la insulina (Song, D. y col., 2004; D'Angelo, G. y col., 2005).

Los animales EP mostraron una hiperglucemia basal en nuestros experimentos. El sentido de estos resultados concuerda con los hallazgos de Vallée, M. y col. (1996), quienes también sometieron a ratas a inmovilización

prenatal, en la última semana de gestación. Este efecto, puede deberse a la acción de la COR, la cual mostró como ya dijimos, un aumento basal en estos animales y una correlación positiva con la glucemia. Los mecanismos por los cuales la COR, genera una hiperglucemia, son varios. Entre ellos se encuentra la disminución de la sensibilidad de los tejidos para la captación de este azúcar y también su utilización por parte de la célula. Corroborando este último resultado, otros investigadores, administrando GC a ratas (Long, C. y col., 1940; Mc Mahon, M. Y col., 1988) o de estrés (Munck, A., 1971) han informado que se produce, una disminución de la utilización periférica de la glucosa. Este proceso se ve disminuido por efecto de la COR, la cual reduce la oxidación de nicotinamida adenina dinucleótido reducido (NADH) a nicotinamida adenina dinucleótido oxidado (NAD⁺). Este último es necesario para que la glucólisis se lleve a cabo. Como consecuencia de ello la glucosa se acumula en las células. Otro mecanismo de disminución de la utilización de la glucosa por efecto de la COR, deriva del aumento de la movilización que esta hormona produce sobre los ácidos grasos del tejido adiposo, los cuales son utilizados como fuente de energía. Esto opera como un mecanismo ahorrador de la glucosa con fines energéticos.

Nuestros resultados podrían deberse también, en gran parte, a la activación del otro componente importante en la respuesta al estrés, como lo es el eje SAM. Este, induce la liberación de A, hormona conocida por su efecto hiperglucemiante. La A ejerce su efecto hiperglucemiante a través de dos mecanismos. El primero de ellos, consiste en un aumento de la velocidad de la glucogenólisis hepática, por lo cual en pocos minutos se liberan grandes cantidades de glucosa hacia la sangre (Poter, D. y Robertson, R., 1973; Yamada, F. y col., 1993). El segundo mecanismo consiste en un efecto lipolítico directo sobre las células adiposas, debido a que activa la lipasa sensible a la insulina en estos tejidos y provoca así, un gran aumento de los ácidos grasos sanguíneos. Estos ácidos grasos son utilizados como fuente de energía, generando como consecuencia, un ahorro de glucosa. Esto produce un aumento de este azúcar en sangre. Por lo expresado anteriormente, los dos

ejes del estrés: el eje HHA y el eje SAM estarían involucrados en la generación de hiperglucemia en los animales sometidos a EP.

La hiperglucemia resultante causará una hiperestimulación tardía de la secreción de insulina (hiperinsulinemia) como mecanismo compensador frente a los valores elevados de glucemia (Ampudia-Blasco, F., 2003). Este efecto hiperinsulinémico, constituye otro de los síntomas del SM, como mencionamos anteriormente y es uno de los resultados obtenidos por nosotros en los animales EP. Estos hallazgos concuerdan con los de Armario, A. y col. (2004). Además, se ha encontrado que la COR aumenta la resistencia a la insulina, por lo cual disminuye el ingreso de la glucosa a las células. Esto se debe, a que los GC favorecen el proceso de gluconeogénesis hepática (Guyton, C. y Hall, J., 2011) y además, aumentan la secreción de insulina por parte del páncreas (Pervanidou, P. y Chrousos, G., 2012). La estimulación crónica de la secreción insulínica, puede provocar un agotamiento funcional de las células β de los islotes de Langerhans (Weyer, C. y col., 1999) para mantener una respuesta adecuada frente a la hiperglucemia (Ampudia-Blasco, F., 2003).

Esta resistencia a la insulina, lleva posteriormente al organismo a desarrollar diabetes mellitus tipo 2 (Chrousos, G. y Gold, P., 1992 y 1998; Chrousos, G., 2000 y 2009). Esta consecuencia podría deberse a que la regulación del balance energético se lleva a cabo mediante la señalización por diversos péptidos en el SNC, entre los que se destacan la insulina, la leptina y posiblemente la grelina. La insulina está involucrada en la regulación de la adiposidad al inhibir la ingesta calórica e incrementar el gasto energético. Esta hormona no entra al cerebro, pero es transportada a través de un proceso mediado por receptores saturables que funcionan como una vía de retroalimentación negativa (Pérez Cruz, E. y col., 2007). Una alteración en los niveles normales de insulina plasmática, trae como consecuencia un aumento de la resistencia a la insulina, debido a una deficiencia de los receptores de esta hormona en las células blanco. Esto genera un círculo vicioso en donde el páncreas sigue emitiendo cada vez más insulina. Después de un largo tiempo, este órgano se agota, pudiendo ocasionar diabetes mellitus tipo 2.

La disminución de la sensibilidad periférica a la insulina acompaña a la alteración de la tolerancia normal a la glucosa, la cual depende de una regulación del tipo *feed-back*, controlado por el efecto de la glucosa plasmática sobre la secreción de insulina y por la acción de ésta en los tejidos periféricos (Ampudia-Blasco, F., 2003).

En nuestros experimentos, los animales EP presentaron una baja tolerancia a la glucosa. Esto puede deberse a que si bien hay altas concentraciones plasmáticas de este azúcar, los receptores de insulina de las células efectoras del cuerpo ubicadas en el hígado, músculo y tejido adiposo, no pueden unirse adecuadamente con esta hormona y por lo tanto no permiten el ingreso de la glucosa a las células. Esto disminuye la sensibilidad de los tejidos efectoras a los efectos metabólicos de dicha hormona, cuya función primordial es el almacenamiento de la energía sobrante.

Otro factor del SM, es la alteración del perfil lipídico, cuyo análisis reveló que el tratamiento prenatal por IMO indujo a un incremento significativo de los niveles plasmáticos de colesterol total, de las HDL-colesterol, de las LDL-colesterol y de los TAG en relación con sus controles. Con respecto al colesterol total, los resultados concuerdan con los de Ruiz de Gordo, J. y col., (1994) y con los de Jané, R. y col. (2002). Este efecto podría ser atribuido a la acción de la COR, ya que esta hormona, al movilizar los ácidos grasos del tejido adiposo, aumenta la concentración de los mismos en la sangre y su utilización con fines energéticos. A esto también se le suma la acción de la A, ya que, como mencionamos anteriormente, en situaciones de estrés aumenta y se caracteriza por tener efecto lipolítico directo sobre las células adiposas. En ellas activa a la lipasa sensible a la insulina y provoca asimismo un gran incremento de la concentración de ácidos grasos libres, los cuales son un estímulo para la secreción de la insulina. En síntesis, durante la respuesta al estrés, la fuerte presencia de la A y la COR, jugaría un rol importante en los cambios séricos de los lípidos (Gervois, P. y col., 2000, Armario, A. y col., 2004)

En nuestros experimentos, también pudimos observar un incremento significativo de los niveles plasmáticos de HDL-colesterol, en los animales EP. Estos resultados, van en el mismo sentido que los obtenidos por otros autores, aplicando otro tipo de tratamiento (Damiano, P. y col., 1999; Renna, N. y col., 2007).

Las ratas son mamíferos HDL-colesterol. Estas lipoproteínas tienen función antiaterogénica, por lo cual la mayor parte del colesterol es transportado por ellas. A diferencia de las ratas, los humanos y otras especies, son mamíferos LDL-colesterol, por lo cual, presentan un mayor riesgo de formar ateromas (Bauer, J. 1996; Maldonado, E. y col., 2001; Maldonado, E. y col., 2002). Las HDL-colesterol intervienen en el transporte inverso del colesterol, el cual representa un mecanismo protector. En este proceso, el exceso de colesterol en los tejidos y en los vasos sanguíneos, es removido y transportado por las HDL-colesterol hacia el hígado, órgano en el que el colesterol es reutilizado o es excretado a través de la bilis (Shah, K. y col., 2001). Este mecanismo es llevado a cabo por la acción de la proteína de transferencia de ésteres de colesterol (CETP), cuyo origen principal es el tejido adiposo. Dicha proteína, transfiere los TAG desde las lipoproteínas ricas en triacilglicéridos (LRT) a las HDL-colesterol y LDL-colesterol, en intercambio con los ésteres de colesterol (EC) (Posadas Romero, C., 2007). Por lo tanto una de las causas por las cuales los niveles de HDL-colesterol se ven aumentados en las ratas, podría ser la deficiencia de la CETP (Maldonado, E. y col., 2001; Brewer, H. y col., 2002).

Otra función de las HDL-colesterol, es la inhibición de la oxidación de las LDL en la pared arterial y la expresión de las moléculas de adhesión de origen endotelial (Nofer, J. y col., 2002; Von Eckardstein, A. y col., 2005).

Los animales EP tienen incrementado el índice aterogénico. A pesar de que ellos presentan las HDL-colesterol elevadas naturalmente, por ser mamíferos HDL-colesterol, esta diferencia podría deberse, por un lado a la acción de la COR, que moviliza los ácidos grasos del tejido adiposo y por otro lado, por acción de la A, por su efecto lipolítico. Como observamos, ambas

incrementan la concentración plasmática de HDL-colesterol. La importancia de este índice es que permite predecir el riesgo de formar placas ateromatosas en las arterias y como consecuencia, de sufrir aterosclerosis, provocando patologías vasculares y/o cardíacas. Debido a que las ratas son HDL-colesterol, tienen menos probabilidad de formar ateromas, por su capacidad antiaterogénica. Otro dato útil que nos da esta relación (colesterol total/HDL-colesterol), es si los niveles del colesterol bueno son suficientes para "manejar" la carga total de colesterol. En definitiva las ratas tienen mayor protección contra la formación de ateromas.

Otro parámetro a tener en cuenta en el SM, son los niveles plasmáticos de las LDL-colesterol. Estas, son las principales lipoproteínas involucradas en el depósito de lípidos en el subendotelio. Debido a que pueden penetrar dentro de la pared arterial pasando entre ó a través de las células endoteliales con una velocidad dependiente de su concentración plasmática (Schreier, L. y col., 2005). Estas lipoproteínas son un indicador de una mayor probabilidad de sufrir aterosclerosis y otras enfermedades coronarias. En nuestros experimentos, las ratas macho EP mostraron un incremento de las LDL-colesterol, datos que concuerdan con los hallazgos de otros autores, los cuales aplicaron otro tipo de estrés, como el estrés psicológico agudo y crónico en ratas macho (Teague, C. y col., 2007) o el estrés crónico por inmovilización durante 10 días asociado al tratamiento con nicotina, en ratas hembra (Manal, M. y col., 1997), los que fueron atribuidos a alteraciones en la COR y en las hormonas femeninas (estrógenos y progesterona). Al igual que el EP en las ratas, el estrés físico provocado por la práctica de actividades deportivas de alta intensidad en los humanos, modifica el perfil lipídico, caracterizado por la elevación de los valores de LDL-colesterol (MacAuley, D. y col., 1996; Santos-Silva, A. y col., 2001; Ruiz, J. y col., 2004), como así también otros valores de dicho perfil lipídico, predisponiendo a un mayor riesgo de enfermedades cardiovasculares. Otra razón posible que contribuye a elevar los niveles de LDL-colesterol, consiste en la disminución de la capacidad de estas proteínas de interactuar con sus receptores, debido a las alteraciones por glicosilación de la estructura de las LDL-colesterol (Austin, M. y Edwards, K., 1996).

También se ha visto, que los ácidos grasos libres liberados en grandes cantidades desde el tejido adiposo, generan a nivel hepático un incremento en la producción de glucosa, triacilglicéridos y secreción de VLDL, asociado, con incremento de las LDL- colesterol (González Rivas, J.P y Molina de González, T., 2011)

Otro de los parámetros plasmáticos que encontramos elevados dentro del perfil lipídico como consecuencia del EP, son los niveles plasmáticos de los TAG. Nuestros resultados concuerdan con otros reportes como los de Jané, D. y col. (2002) en los que los animales fueron sometidos a estrés crónico por IMO, así como también los de otros autores que aplicaron otro tipo de estrés, como deportes con alto grado de esfuerzo físico (Ruiz, J. y col., 2004).

Este aumento de los TAG, podría deberse a que la insulina, la cual esta aumentada en estos animales, aumenta la actividad de la enzima lipolítica lipoproteinlipasa (LPL) que se encuentra localizada en la superficie endotelial de los tejidos adiposos y musculares. Esto promueve el movimiento de ácidos grasos hacia el tejido adiposo, ya que, esta enzima hidroliza rápidamente a los TAG, que se desprenden de la superficie del quilomicrón para entrar en contacto con la pared endotelial, siendo estos compuestos transferidos a la familia de las HDL-colesterol. De esta manera, el quilomicrón se transforma en un remanente que es finalmente tomado por el hígado. Si por algún motivo se encuentra alterado o demorado el catabolismo de los quilomicrones, se origina una hipertrigliceridemia (Schreier, L. y col., 2005)

En síntesis, las alteraciones en el perfil lipídico obtenidos en nuestro laboratorio en las ratas EP, podrían deberse a la acción de los GC y CA. Como se expresó anteriormente, el estrés por IMO, produce la activación de los ejes HHA y SAM, liberadores de dichas hormonas. Esto es un factor de riesgo mayor para el desarrollo de la enfermedad cardiovascular prematura (Posadas Romero, C., 2007)

El estado redox tanto a nivel subcelular, celular, tisular y de los organismos es una realidad compleja que se puede medir, a través de una

serie de biomarcadores del EO, por lo cual se han utilizado una gran diversidad de métodos para lograrlo (Elejalde Guerra, J., 2001; Souki, A. y col., 2007). En nuestro trabajo, evaluamos el EO a través de la determinación de la peroxidación lipídica, mediante la valoración plasmática de sustancias reactivas al TBARS como el MDA. Los resultados obtenidos demostraron un incremento de los valores de MDA en los animales sometidos al EP. Estos datos concuerdan con los obtenidos por otros investigadores, donde aplicaron otro tipo de tratamientos (Ravi K. y col., 2004; Renna, N. y col., 2007; Jin L. y col., 2008; Mora; A. y col., 2009). Como ya mencionamos anteriormente, el EO, se produce por un aumento de las ROS y los RL.

En el presente trabajo, como ya dijimos, se produjo un aumento de la resistencia a la insulina y de la intolerancia a la glucosa, coincidiendo estos resultados con los de Fernández-Real, J.M. (2008). Además, se vieron aumentados la hiperglucemia y los niveles de ácidos grasos como también lo demostraron Bloch-Damti A. y col. (2006) y Ros Perez, M. y Medina-Gomez, G. (2011). Todos estos hallazgos conllevan al incremento del EO. Por otro lado, dentro de la dislipemia obtenida en nuestros experimentos, se encuentra el aumento de las LDL- colesterol, cuya oxidación, favorece el aumento del EO, al disminuir la disponibilidad de óxido nítrico a través de la reducción de la actividad de la enzima que lo genera en el endotelio (eNOS) (Schreier, L. y col., 2005). Se ha demostrado una estrecha relación entre las ROS y las LDL- colesterol y se sabe que el aumento de ambas, tiene un valor predictivo directo en la aparición de aterosclerosis (Fernando, R. y col., 1998; Elejalde Guerra, J., 2001). Además los altos niveles de glucosa, característicos de la diabetes, inducirían a la glicosilación no enzimática de proteínas. Esta glicosilación no enzimática altera la estructura y función de las proteínas (Romero-Alvira, D., 1997) y como es conocido, la autooxidación de azúcares genera ROS, aumentando el EO. Pero éste, no sólo aumenta por esta razón, sino también, por la disminución de antioxidantes (Kashiwagi A., y col., 1996). La vía del poliol es un posible mecanismo por el cual la hiperglucemia puede alterar la función y la estructura de las células afectadas por las complicaciones

diabéticas. La activación de la vía del poliol disminuiría el NADPH y los niveles de glutatión, aumentando de esta manera el EO (Bravi, M., 1997).

CONCLUSIÓN

El estrés prenatal crónico por inmovilización en ratas macho adultas produce:

- ✓ Hiperglucemia, hiperinsulinemia y disminuye la tolerancia a la glucosa.

- ✓ Alteraciones en el perfil lipídico, que se manifiestan con un incremento del colesterol total, las HDL-colesterol, las LDL-colesterol y los triacilglicéridos, y el índice aterogénico.

- ✓ Incrementa el estrés oxidativo hepático.

Todos estos efectos podrían ser debidos, por lo menos en parte, a la hiperactividad del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal.

EL ESTRÉS PRENATAL CRÓNICO POR INMOVILIZACIÓN, EN RATAS MACHO ADULTAS, PRODUCE ALTERACIONES DE PARÁMETROS DE LA REGULACIÓN DE LA GLUCEMIA, DEL METABOLISMO DE LÍPIDOS Y DEL ESTRÉS OXIDATIVO HEPÁTICO.



PROYECCIONES

- Determinar parámetros de la regulación de la glucemia, del metabolismo de los lípidos y del estrés oxidativo en ratas macho estresadas prenatalmente por IMO y sometidas a un estrés agudo postnatal por IMO.
- Determinar parámetros de la regulación de la glucemia, del metabolismo de los lípidos y del estrés oxidativo en ratas macho estresadas prenatalmente por IMO y sometidas a un estrés agudo postnatal por nado.
- Profundización del estudio sobre parámetros del estrés oxidativo en hígado y músculo.

ABREVIATURAS

O ₂ ⁻	Anión Superóxido
4-AAP	4-aminoantipirina
4-CP	4-clorofenol
A	Adrenalina
ACTH	Hormona adrenocorticotropa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosina difosfato
ANOVA	Análisis de la varianza
ARNs	Ácido ribonucleicos
ATP	Adenosina de trifosfato
AVP	Arginina-Vasopresina
B	Blanco
BHT	Butilhidroxitolueno
CA	Catecolaminas
CETP	Proteínas transportadoras de colesterol esterificado
COR	Corticosterona
CP	Control Prenatal
CRH	Hormona liberadora de corticotrofina
D	Desconocido
EC	Ésteres de Colesterol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EO	Estrés Oxidativo
EP	Estrés Prenatal
GC	Glucocorticoides
GR	Receptores de glucocorticoides
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HDL- colesterol	Lipoproteínas de alta densidad
HHA	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal
HHG	Eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadal
IMO	Inmovilización en plancha
LC	Locus ceruleus
LDL-colesterol	Lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipoproteinlipasa.
LRT	Lipoproteinas ricas en Triglicéridos
MANOVA	Análisis de Multivarianza
MDA	Malondialdehido
MR	Receptores de mineralocorticoides
NA	Noradrenalina
NAD ⁺	Nicotinamida adenín-dinucleótido (forma oxidada)

NADH	Nicotinamida adenin-dinucleótido (forma reducida)
NO [·]	Óxido Nitrico
NO ₂ [·]	Dióxido nítrico
OH [·]	Radical Hidroxilo
POMC	Proopiomelanocortina
PVN	Núcleo Paraventricular
RIA	Radio inmunoensayo
RL	Radicales libres
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SAM	Eje Simpático-Adreno-Médular
SM	Síndrome metabólico
SNC	Sistema Nervioso Central
SNS	Sistema Nervioso Simpático Sistemico
St	Standard
TAG	Triacilglicéridos
TBA	Tiobarbitúrico
TBARS	Ácido Tiobarbitúrico
TMB	Tetrametilbencidina
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

BIBLIOGRAFÍA

Alberti KG, Zimmet P. y Shaw J. 2006. Metabolic syndrome a new world wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med*; 23: 469-80.

Álvarez Díaz, A., H. Pérez, M. De la Cruz, J. Quincosa y A. Puzo. 2004. *Fisiología Animal Aplicada*. Ed. F. Varela. La Habana. 386p.

Ampudia-Blasco, F..2003. Fallo celular beta y progresión de la diabetes mellitus tipo 2. *Endocrinol Nutr* ; 50(7):274-9.

Armario, A.. 1998. Estrés: concepto y respuesta fisiológica. Revisión bibliográfica presentada en el curso dictado en el Departamento de Biología Molecular. Fac. de Cs. Exactas, Fco-Qcas y Naturales. Río Cuarto, agosto de 1998.

Armario, A., A. Valles, S. Dal-Soto, C. Marquez y X. Belda. 2004. "A single exposure to severe stressors causes long-term desensitisation of the physiological response to the homotipe stressor". *Stress* 7(3):157-172.

Austin M, Edwards K. 1996. Small, dense low density lipoprotein, the insulin resistance syndrome and noninsulin-dependent diabetes. *Curr Opin Lipidol*; 7:167-71.

Baez-Duarte, B., Pérez-Fuentes, D., Zamorra-Ginez, D., Torres-Rasgado, D., Ruiz-Vivanco, G., Nievas-Vázquez, M. 2011. Síndrome metabólico y su relación con el estrés oxidativo. *Diabetes Hoy para el medico y el profesional de la salud*. Vol. XIII n° 5.

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

- Bauer, J.E.. 1996.** Comparative lipid and lipoprotein metabolism. *Vet Clin Phatol.* 25. 49-56.
- Bedregal, P., Shand, B., Santos, M. J., Ventura-Juncá, P.. 2010.** Aporte de la epigenética en la comprensión del desarrollo del ser humano. *Rev Med Chile;* 138: 366-372.
- Bensi, N.. 1999.** Efecto del estrés crónico sobre el metabolismo hidrosalino en ratas. Tesis del Doctorado en Ciencias Biológicas.
- Berthold, K., Peter, D., Hans, A. Margaret, A.. 2005.** Early nutrition and its later consequences: new oppotunities Perinatal Programming of Adult Health-EC Supported Research. Springer Science+Business Media, Inc.
- Bloch-Damti, A., Potashnik, R., Gual, P., Le Marchand-Brustel, Y., Tanti, J.F., Rudich, A. y col.. 2006.** Differential effects of IRS1 phosphorylated on Ser307 or Ser632 in the induction of insulin resistance by oxidative stress.*Diabetologia;* 49:2463-73.
- Bloomerfield, F.H., 2011.** Epigenetic modification may play a role in the developmental consequences of early life events. *J Neurodev Disord;* 3:348-55.
- Bonari L , Pinto N, Ahn E, Einarson A, Steiner M, Koren G., 2004.** Perinatal risks of untreated depression during pregnancy. *Can J Psychiatry.* Nov;49(11):726-35.
- Boveris, A. 2005.** La evolución del concepto de radicales libres en biología y medicina. *Ars Pharm.* 46 (1): 85-95.
- Buege,J.A. y Austs, D. 1978.** Microsomal lipidperoxidation. In: *Methods in Enzymology*, Vol. 51. Eds.S.Fleischer, L.Packer. pp.303-310, Academi Press, NewYork.
- Brewer, H. 2002.** *Atlas de aterosclerosis. Factores de riesgo y tratamientos.* 7:111-112. Ed. Lazar.
- Brown MS, Goldstein JL. 1986.** A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science;* 232:34-47.

- Cadenas, E.. 1989.** Biochemistry of oxygen toxicity. *Ann. Rev. Biochem.* 58: 79-110.
- Cai, H., Harrison, D.G.. 2000.** Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ Res*; 87: 840-844.
- Calmarza Calmarza, P.. 2008.** "Lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas". *Rev. Electrón Biomed.* España. 3:52-60.
- Cap. Justo R. Venereo Gutiérrez. 2002.** Daño oxidativo, Radicales Libres y Antioxidantes. *Rev. Cubana Med. Milit*; 31 (2):126-33.
- Carlson, N., 1996.** Fundamentos de Psicología Fisiológica. (3era. Edición). México: Prentice-Hall Hispanoamericana, S.A.
- Cerdá Micó, Concha y Sáez Tormo, Guillermo. 2009.** Implicaciones fisiopatológicas del estrés oxidativo fetal. Real Academia Nacional De Farmacia. Monografía XXIII. Desarrollo perinatal: origen de patologías adultas. Madrid.
- Céspedes, E., G. Ponte González, G. Riverón Formet y J. Castillo Herrera. 2008.** "Oxidative stress markers in hypertensive patients from a rural population in Havana province". *Rev. Cubana Invest. Biomed.* Vol. 7 N° 1
- Chen Cárdenas, S. M.; Mayer, N.; Romanini, M. C.; Rolando, A. N.; Liaudat, A. C.; Brun N.; Vivas, A.; Gauna, H. F. & Rodríguez, N. 2013.** Reproductive response in offspring male rats exposed to prenatal stress and to early postnatal stimulation. *International Journal of Morphology.* Chile. 31(2):754-764.
- Chesseman K.H. y Slater T.F. 1993.** An introduction to free radical biochemistry. *Br Med Bull*; 49: 481-493.
- Chrousos, G. y Gold P.W.. 1992.** The concepts of stress and stress system disorders. *JAMA*; 267: 1244-52.
- Chrousos, G. y Gold P.W.. 1998.** A healthy body in a healthy mind and vice versa- the damaging power of "uncontrollable" stress. *J Clin Endocrinol Metab*; 83: 1842-5.

Chrousos, G.. 1999. Stressor, stress and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. Ann NY Acad Sci; 851: 311-35.

Chrousos, G.. 2000. The role of stress and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the pathogenesis of the metabolic syndrome: neuroendocrine and target tissue-related causes. Int J Obes Relat Metab Disord. 24 (suppl. 2): S50-5.

Chrousos, G.. 2009. Stress and disorders of the stress system. Nat Rev Endocrinol; 5: 374-81.

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

Coles ME, Heimberg RG . 2002. Memory biases in the anxiety disorders: current status. Clin Psychol Rev 22:587–627.

Cooper, S.A. 2007. Renin-angiotensin-aldosterone system and oxidative stress in cardiovascular insulin resistance. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 293(4):H2009-23.

Cordero A., Alegría, L. y Montserrat León. 2005. Prevalencia del Síndrome Metabólico. Revista Española de Cardiología Suplementos. Vol. 5(4): 11D-15D.

Costantine, Tsigo. y Chrousos, George. 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. Journal of Psychosomatic Research 53: 865-871.

D`Angelo, G., Elmarakby, A.A., Pollock, D.M. y Stepp, D. W. 2005. Fructose feeding increases insulin resistance but not blood pressure in Sprague- Dawley rat. *Hypertension*, 46: 806-811.

Damiano, P., Rosón, M., Armando, I., Nowiski, S., Dascal, E., Cuniberti, L. Albornoz, L., De la Riva, I. 1999. Potential role of Glycerol leading to rat fructose hypertension. *Hypertension*; 34 (part 2): 1007-1011.

De Kloet, E. y Reul, J.. 1987. Feedback action and corticosteroids on brain function: a concept arising from and heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology*. 12: 83-1005.

de Quervain D.J.F., Aerni, A., Schelling, G., Roozendaal, B.. 2009. Glucocorticoids and the regulation of memory in health and disease. *Front Neuroendocrinol* 30:358–370.

Dickerson, S. y Kemeny, M.. 2004. Acute stressor and cortisol responses: a theoretical integration and synthesis of laboratory research. *Psychol Bull*. 130: 355-391.

Dorthe Hansen Precht, Per Kragh Andersen, Jørn Olsen. 2007, Severe life events and impaired fetal growth: a nation-wide study with complete follow-up. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 86 (3):266-75.

Dröge, W.. 2002. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*; 82: 48-95,

Eckel RH, Grundy SM, Zimmet PZ. 2005. The metabolic syndrome. *Lancet* ;365:1415–28.

Elejalde Guerra, J.L. 2001. Éstres oxidativo, enfermedades y tratamientos antioxidantes. *AN. MED. INTERNA (Madrid)*. Vol. 18, N|6, pp.326-335.

Expert Panel of National Cholesterol Education Program. 2001. *JAMA* 285/19:2486.

Fernández-Real, J.M.. 2008. Resistencia a La insulina y aterosclerosis. Impacto del estrés oxidativo en la función endotelial. *Ver Esp Cardiol Supl*. 8: 45C-52C.

- Fernando, R.L., Verghese, Z., Moorhead, J.F. 1998.** Differential ability of cells to promote oxidation of low density lipoproteins in vitro. *Clin Chim Acta*; 269: 159-173.
- Ford, E.S., Mokdad, A.H., Gales, W.H. 2003.** The metabolic syndrome and antioxidant concentrations: findings from the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Diabetes*.;52(9):2346-52.
- Fossati, P.. 1982.** *Clin. Chem.*,28/10:2077.
- Fowden, A., Giussani, D. y Forhead, A. 2006.** Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology* .21: 29-37.
- Ganong, W., Barrett, K., Boitano, S., Barman, S., Brooks, H. 2010.** *Fisiología Médica*. Ed. McGRAW-HILL INTERAMERICANA EDITORES, S. A. de C. V.
- Gervois, P., Torra, I., Fruchart, J.. 2000.** Regulation of lipid and lipoprotein metabolism by PPAR activators. *Clin Chem Lab Med*. 38: 3-11.
- Gilmer WS, Trivedi MH, Rush AJ, Wisniewski SR, Luther J, Howland RH, Yohanna D, Khan A, Alpert J.. 2005.** Factors associated with chronic depressive episodes: a preliminary report from the STAR-D project. *Acta Psychiatr Scand* 112:425–433.
- Gluckman, P., Hanson, M., Cooper, C. y Thornburg, K. 2008.** Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *N. Engl. J. Med.* 3: 61-73.
- González Gómez, B. y A. Escobar. 2002.** "Neuroanatomía del estrés". *Rev Mex Neuroci.* 3(5): 273-278.
- González Rivas, J.P. y Molina de González, T.. 2011.** Síndrome metabólico. *Med Interna (Caracas)*; 27 (3): 156 – 163.
- González Sotolongo, O., Gámez, Á. A., Dr. González Menocal, M., Tte. Cor. Pérez, A. J. L.. 2009.** Oxidative stress assessment in patients presenting with metabolic syndrome. *Revista Cubana de Medicina Militar* ; 38(3-4)40-52.

Gourley SL, Kedves AT, Olausson P, Taylor JR.. 2009. A history of corticosterone exposure regulates fear extinction and cortical NR2B, GluR2/3, and BDNF. *Neuropsychopharmacology* 34: 707–716.

Govindarajan, G., Hayden, Mr., Cooper, S.A.. 2006. Metabolic desarrangments in the insulin resistant heart. *J Cardiometab Syndr*.;1(2):102-6.

Greco, G., G. Valgo, R. Brunelli, G. Costa, M. De Spirito, L. Lenzi, G. Mei, F. Ursini y Parasassi, T. 2009 "Generation in human plasma of misfolded, aggregation prone electronegative low density lipoprotein". *Biophysical Journal*. Vol. 7 2:628-635

Grundy, S.M.. 1998. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am J. Clin Nutr*; 67(suppl):563S-72S.

Gutteridge J.. 1994. Free radicals and aging. *Rev Clin Gerontol*; 4: 279-288.

Guyton, C.G. and Hall, J.E. 2011. Tratado de Fisiología Médica. 12ª Edición. Elsevier.

Hall, J.G.. 2007. The importance of the fetal origin of adult disease for geneticists. *Clin. Genet*; 72: 67-72.

Halliwell B.. 1991. Reactive oxygen species in living systems: source biochemistry, and role in human. *Am J Med*; 91 (Suppl 3C): 14S-22S

Halliwell B. y Gutteridge JMC..1992. Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease; Where are we now? *J Lab Clin Med*; 119: 598-620.

Halliwell, B. y Gutteridge J.M.C.. 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford University Press. New York.

Hansel, B., Giral, P., Nobecourt, E.. 2004. Metabolic syndrome is associated with elevated oxidative stress and dysfunctional dense high-density lipoprotein particles displaying impaired antioxidative activity. *J Clin Endocrinol Metab*.;89:4963-71.

Harman D.. 1992. Free radical theory of aging. *Mutat Res*. 275: 257-266.

Harrison, S., K. Griendling, U. Landmesser, B. Homing y H. Drexler. 2003. "Role of oxidative stress in atherosclerosis". *Am. J. Cardiol.* 91:7A-11A.

Hernández Mata y Leonardo R.. 2002. Bases Neurofisiológicas del Estrés (Stress Neurophysiological Bases), www.comportamental.com.

Holliday, R.. 2002. Epigenetics comes of age in the twenty first century. *Journal of Genetics*; 81: 1-4..

Holliday, R.. 2006. Epigenetics. A historical overview. *Epigenetics*; 1:76-80

Hsia, S.H.. 2003. "Trastornos del metabolismo lipídico". *Endocrinología y Metabolismo.* 35: 544-572.

Hwang IS, Ho H, Hoffman BB y Reaven GM. 1987. Fructose-induced insulin resistance and hypertension in rats. *Hypertension*; 10: 512-516.

Jane, D., Sureda, V., Benavides, A., Peinado, J., Lopez, Tejero Md, Lloberas, M.. 2002. Immobilization stress alters intermediate metabolism and circulating lipoproteins in the rat. *Metabolism*, vol 51, 7: 925-931.

Jin L, Chen J, Wang L, Peng W, Yan X, Zhang Q, et al. 2008. Increased glycated albumin and decreased esRAGE concentrations are associated with in-stent restenosis in Chinese diabetic patients. *Clin Chim Acta*; 396 (1): 33-37.

Kappor, A., Dunn, E. y col.. 2006. Fetal programming of hypothalamo-pituitary-adrenal function: prenatal stress and glucocorticoids. *J. Physiol.* 572:1-44.

Kashiwagi A, Asahina T, Nishio Y, Ikebuchi M, Tanaka Y, Kikkawa R, Shigeta Y. 1996. Glycation, oxidative stress, and scavenger activity: glucose metabolism and radical scavenger dysfunction in endothelial cells. *Diabetes*; 45: 84-6.

Kemppainen, R., y Behrend, E.. 1997. Adrenal physiology. *Adrenal disorders*, 27: 2 173-186.

- Kendler KS, Karkowski LM, Prescott CA .1999.** Causal relationship between stressful life events and the onset of major depression. *Am J Psychiatry* 156:837–841.
- Koenen KC, Harley R, Lyons MJ, Wolfe J, Simpson JC, Go J.. 2002.** A twin registry study of familial and individual risk factors for trauma exposure and posttraumatic stress disorder. *J Nerv Ment Dis* 190:209–218.
- Koenen KC, Moffitt TE, Poulton R, Martin J, Caspi A.. 2007.** Early childhood factors associated with the development of post-traumatic stress disorder: results from a longitudinal birth cohort. *Psychol Med* 37:181–192.
- Knight, JA. 1999.** Free radicals: their presence in biological systems. In: *Free radicals, antioxidants, aging, and disease*. Washington: AACC Press; p. 21-43.
- Leng G., y Russell, A., 1998.** Learning to cope with repeated stress. *The Journal of Physiology*. 510 (2), 331-331.
- Levitt, N., Lambert, E. y col. 2000.** Impaired glucose tolerance and elevated blood pressure in low birth weight, nonobese, young south African adults: early programming of cortisol axis. *J. Clin. Endocrinol Metab.* 85: 4611-8.
- Li, L.F. y Li, J.. 2007.** Link between oxidative stress and insulin resistance. *Clin Med Sci J.*;22(4):254-9.
- Liaudat A.C., Nancy R., Vivas A., Gauna H.F. , Mayer N.I.. 2012.** Effect Of Early Stimulation On Some Immune Parameters In A Model Of Prenatally Stressed Rats. *International Journal of psychology studies*. Canadá. Vol 4, No 3: 203-209.
- Long, C., Katzin, B. y E. Fry. 1940.** The adrenal cortex and carbohydrate metabolism. *Endocrinology*. 26: 309-344.
- MacAuley D, McCrum EE, Stott G, Evans AE, Duly E, Trinick T, et al. 1996.** Physical activity, lipids, apolipoproteins, and Lp(a) in the Northern Ireland Health and Activity Survey. *Med Sci Sports Exerc*;28:720-36.

- Maccari, S., Mormende, M. Piazza, P., Simon, H., Angelucci, L., Le Moal, M. 1992.** Hippocampal type I and type II corticosteroid receptor are modulated by central noradrenergic systems. *Psychoneuroendocrinology* 17: 103-112.
- Maccari, S., Piazza, P.V., Kabbaj, M. Barbazanges, A., Simon, H., Le Moal, M.. 1995.** . Adoption reserves the long term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. *Neuroscience* 15:1 110-116
- Maccari, S, Darnaudery, M., Morley-Flotcher, S., Zuen, A., Cinque, C., y Van Reeth. 2003.** Prenatal stress and long-term consequences: implications of glucocorticoid hormones. *Neurosc. and Biobehav. Ver.* 27: 119-127.
- Maldonado, E.; Romero, J.; Ochoa, B.; Aveldaño, M. 2001.** Lipids and fatty acid composition of canine lipoproteins. *Comp. Biochem. Physiol.* 128B: 719-729
- Maldonado, E., Casanave, E., Aveldaño, M.. 2002.** Major plasma lipids and fatty acids in four HDL- mammals. *Elsevier Science.* 132: 297-303.
- Manal, M., T. Atef, M. Tarek y A. Nabila. 1997.** "Nicotine and stress: Effect on sex hormones and lipid profile in female rats". *Pharmacological Research.* Vol. 35 N°3.
- Marcincak, S., Sokol, J., Turek, P., Rozanska, H., Dicakova, Z., Mate, D., Popedka, P., Kozim, P.. 2003.** Comparative evaluation of analytical techniques to quantify malondialdehyde in broiler meat. *Bull Vet Inst Pulawy* 47: 491-496.
- Maritim, A.C., Sanders, R.A., Watkins, J.B.. 2003.** Diabetes, oxidative stress and antioxidant: a review. *J Biochem Mol Toxicol.*;17(1):24-38.
- Marquez, C., Nadal, R. y Armario, A. 2004.** The Hypothalamic-Pituitary-Adrenal and glucose response to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 123, 301-612.
- Marsland, A., T. Herbert, M. Muldoon, E. Bachen, S. Patterson y S. Cohen. 2002.** "Lymphocyte subset redistribution during acute laboratory stress in young adults: mediating effects of hemoconcentration". *Health Psychol.* 16:341-348.

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

Martínez, L.O., S. Jacquet, F. Terce, X. Collet, B. Perret y R. Barbaras. 2004. "New insight on the molecular mechanisms of high-density lipoprotein cellular interactions". *Cell Mol. Life Sci.* 61:2343-60.

Mayer N., Greco C., Bertuzzi M., Rodriguez N., Vivas A., Gauna H. 2011. *Immobilization stress responses in adult rats exposed in uterus to immobilization*" *Stress and Health.* Publicado Online ISSN: 1532-2998. Publicado Online. ISSN: 1532-2998. 27 (2): e1-e10.

McEwen BS. 2008. Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. *Metabolism;* 57: S11-5.

McIntyre CK, Hatfield T, McGaugh JL. 2002. Amygdala norepinephrine levels after training predict inhibitory avoidance retention performance in rats. *Eur J Neurosci* 16:1223–1226.

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

Meaney, M, Szyf, M. y Seckl, J.. 2007. Epigenetic mechanisms of perinatal programming of hypothalamic-pituitary-adrenal function and health. *Trends Mol Med.;* 13: 269-77.

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

Miller CA, Campbell SI, Sweatt JD. 2008. DNA methylation and histone acetylation work in concert to regulate memory formation and synaptic plasticity. *Neurobiol Learn Mem;* 89: 599-603.

- Mora H., Ángela C., Aragón N., Diana M, Ospina G., Luis F. 2009.** Caracterización del estrés oxidativo en ratas wistar diabéticas por estreptozotocina. VITAE, Revista De La Facultad De Química Farmacéutica. Volumen 16 (3): 311-319
- Moscoso, M. 2009.** De la mente a la célula: Impacto del estrés en psiconeuroinmunoendocrinología. LIBERABIT: Lima (Perú) 15(2): 143-152.
- Mueller, D., Porter, JT, Quirk, GJ. 2008.** Noradrenergic signaling in infralimbic cortex increases cell excitability and strengthens memory for fear extinction. J Neurosci 28:369–375.
- Munck, A..1971.** Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues: Old and new evidence, molecular mechanisms and physiological significance. Perspect. Biol. Med. 14: 265-289.
- Muñoz-Abellán C, Daviu N, Rabasa C, Nadal R, Armario A. 2009.** Cat odor causes long-lasting contextual fear conditioning and increased pituitary-adrenal activation, without modifying anxiety. Horm Behav. 56(4):465-71.
- Neurooz-zadeh, J. 1999.** Ferrous ion oxidation in presence of xylenol orange for detection of lipid hydro peroxides in plasma. Methods Enzymol, 300: 58-62.
- Nofer, J.R., B. Kehrel, M. Fobker, B. Levkau, G. Assmann y Von Eckardstein, A.. 2002.** "HDL and arteriosclerosis: beyond reverse cholesterol transport". *Atherosclerosis*. 161:1-16.
- Oberlander TF, Weinberg J, Papsdorf M, Grunau R, Misri S, Devlin AM. 2008.** Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses. *Epigenetics*; 3: 97-106.
- Ordovas, J. y Corella D. 2005.** Genetic variation and lipid metabolism: Modulation by dietary factors. *Curr Cardiol Rep.*7, 480-486.
- Owen, D., Marcus, H. y col., 2005.** Maternal adversity, glucocorticoids and programming of neuroendocrine function and behaviour. *Neuroscience and Behavioral Reviews* 20: 209-226.

Pascual, A.M., Pascual, L., Suárez, L.G. 2009. Síndrome metabólico y desarrollo perinatal: Alteraciones corticosuprarrenales.

Pascual-Leone, A.M., 2007. Desarrollo fetal y neonatal In: Procesos epigenéticos: postformación y factores externos pág. 45-89. Curso 23- 26 de Octubre 2006. Coordinado por A.M. Pascual-Leone. *Instituto de España Madrid.*

Pérez Cruz, Elizabeth, Serralde Zúñiga, Aurora Elizabeth, Meléndez Mie, Guillermo. 2007. Efectos beneficiosos y deteleteos del consumo de fructuosa. *Revista de Endocrinología y Nutrición* Vol. 15, No. 2: 67-74.

Pervanidou, P. y Chorusos, G. 2012. Metabolic consequences of stress during childhood and adolescence. *Metabolism Clinical and Experimental Review*; 61: 611-619.

Pineda, C.A.. 2008. Síndrome Metabólico: Definición, historia, criterios. *Colomb Med.*; 39: 96-106.

Pitman, D., Natelson, B., Ottenweller, J., Mccarty, R., Tapp, W.. 1995. Effects of exposure to stressors of varying predictability on adrenal functions in rats. *Behav. Neurosc.* 109(4): 767-776.

Posadas Romero, C. 2007. Aspectos Fisiopatológicos del síndrome metabólico. *Archivos de Cardiología de Mexico.* Vol. 77 Supl. 4/Octubre-Diciembre:S4, 42-47.

Porte, D. y Roberson, R.. 1973. Control of insulin secretion by catecholamines stress and the sympathetic nervous system. *Federation Proc.* 32:1792-1793.

Ravi K, Ramachandran B, Subramanian S. 2004. Effect of *Eugenia jambolana* seed kernel on antioxidant defense system in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Life Sci.* 75 (22): 2717-2731.

Razin A, Riggs AO. 1980. DNA methylation and gene function. *Science.* 210: 604-10.

- Renna, N., Vazquez, M., Gonzalez, S., Lama, C., Cruzado Monserrat. 2006.** Vascular Expression Of Proinflammatory Transcription Factors In A Model Of Metabolic Síndrome. *Rev. Argent. Cardiol.*; 75 (1):36-4.
- Rice, F., Jones, I. y Thapar, A. 2007.** The impact of gestational stress and prenatal growth on emotional problems in offspring: a review. *Acta. Psychiatr. Scand.* 115: 171-183.
- Rodríguez, N., Mayer, N., Gauna, H.F. 2007** Effects of prenatal stress on male offspring maturity. *BIOCELL* 31 (1): 67-74.
- Romanini, M. Paz D., Rodríguez, N., Rolando, A., Mugnaini, M, Soñez, C, Bozzo, A., Marioli, J.M., Pastorino, I. y Gauna. 2007.** Relative concentrations of placental lactogen II and PRL-like Protein-A in stressed rats placental. *International Journal of Morphology.* 25.
- Romero-Alvira D.. 1997.** Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Consideraciones generales. En: Romero-Alvira D, Roche E. *Cardiología, estrés oxidativo, nutrición y biología molecular. Bases y aplicaciones sobre el estrés oxidativo, aspectos nutricionales y de la biología molecular en cardiología.* ENE Ediciones: 13-51
- Ros Pérez, M. y Medina-Gómez, G. 2011.** Obesidad, adipogénesis y resistencia a la insulina. *Endocrinol Nutri.*; 58 (7): 360-369.
- Rousseaux Reynoird, N., Escoffier E. 2008.** Epigenetic reprogramming of the male genome during gametogenesis and in the zygote. *Reprod Biomed Online*; 16: 492-503.
- Ruiz De Gordo, J., Santafe, J., Segarra, D.. 1994:** Modifications of rat plasma lipoproteins induced by acute immobilization stress. *Psychosom Med.* 56: 486- 471.
- Ruiz, J.R., J. Mesa, I. Mingorance, A. Rodríguez Cuartero y M.J. Castillo. 2004.** "Deportes con alto grado de estrés físico afectan negativamente el perfil lipídico plasmático". *Rev. Esp. Cardiol.* 57:499-506

Salazar, D. 2009. *Lípidos y endotelio. Fisiopatología y Metabolismo de las VLDL.* Pp: 2-6.

Sanchez-Lozada LG, Tapia E, Lopez-Molina R, Nepomuceno T, Soto V, Avila-Casado C, Nakagawa T, Johnson RJ, Herrera-Acosta J, Franco M. 2007. Effects of acute and chronic L-arginine treatment in experimental hyperuricemia. *Am J Physiol Renal Physiol* 292: F1238–F1244.

Sánchez-Rodríguez, Martha A., Edelmiro Santiago-Osorio, Luis Alberto Vargas, Víctor Manuel Mendoza-Núñez. 2004. Propuesta de un constructo para evaluar integralmente el estrés oxidativo. Volumen 29 No. 3. p. 81-90

Santos-Silva A, Rebelo MI, Castro EM, Belo L, Guerra A, Rego C, et al. 2001. Leukocyte activation, erythrocyte damage, lipid profile and oxidative stress imposed by high competition physical exercise in adolescents. *Clin Biochim Acta*;306:119-26.

Sarafidas, P.A., Grekasi, D.M.. 2007. Insulin resistance and oxidant stress: An interrelation with deleterious renal consequences. *J Cardiometab Syndr.* 2(2):139-42.

Schreier, L., F. Brites, G. Berg y R. Wikinski. 2005. "Lipoproteínas plasmáticas y su relación con la aterotrombosis". En: *Trombosis. Fisiología, mecanismo de enfermedad y tratamiento.* Ed. Akadia. 13: 311-329.

Scoppa, H.G.. 2010. Efectos del estrés crónico sobre la concentración, composición química y aterogenicidad de las apolipoproteínas y las lipoproteínas plasmáticas en ratas. Tesis de Doctorado en Cs. Biológicas.

Scott, M. Grundy, M.D., PhD; H. Brewer, Jr, MD; James I. Cleeman, M.D.; Sidney C. Smith, Jr, MD; Claude Lefant, M.D. 2004. Definition of Metabolic Syndrome. *Circulation*; 109:433-438.

Shah, K. Kaul, S., Nilsson, J. Cercek, B.. 2001. Exploiting the vascular protective effects of high-density lipoprotein and its apolipoproteins: An idea whose time of coming is coming. Part I. *Circulation*; 104: 2376-2383.

Seidel, D. 1982. Ann. Clin. Biochem. 19:278.

Sies, H. 1985. Vitamins E and C, α -carotene, and other carotenoids as antioxidants. Am J Clin Nutr. 62(Suppl):13155-215.

Senturk, U.k., Gunduz, F., Kuru, O., Gunnur, K., Ozkaya, Y.G., Yesilkaya, A.. 2005. Exercise-induced oxidative stress leads hemolysis in sedentary but not trained humans. J Appl Physiol. 99: 1434-1441.

Shonkoff, J.P. y Phillips, D.A.. 2000. (Editors) *From Neurons to Neighborhoods. The Science of Early Childhood Development.* Washington DC: National Academy Press.

Soca, P. E. 2009. Dislipidemia. ACIMED. 20(6): 265-273

Song, D., Arikawa, E., Galipeau, D., Battell, M., McNeill, J.H. 2007. Androgens are necessary for the development of fructose-induced hypertension. *Hypertension* 43: 667-672.

Souki A, Cano C, Mengual E, García D, Torres D, Almarza J, Urdaneta Y, León L, Chávez Z, Molero E, Medina M, Amell A. 2007. Marcadores biológicos del estrés oxidativo. "Distribución por edad y sexo de las concentraciones basales de MDA, NO y ácido úrico en niños y adolescentes de Maracaibo-Venezuela". Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica. Vol. 26 (2).

Stein, N., Osler, E., Greenman, Y.. 2007. Hipoadionectinemia as a marker of adipocyte dysfunction part II: The funcional significance of low adiponectin secretion. J Cardiomet Synd. 2(4):288-94.

Stuffrein-Roberts S, Joyce PR. 2008. Role of epigenetics in mental disorders. Aust N Z J Psychiatry; 42: 97-107.

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

Talge, N.M., Neal, C., Glover, V., 2007. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J. Child. Psychol. Psychiatry.* 48, 245–261.

Teague, C., F. Dhabhar, R. Barton, B. Beckwith-Hall, J. Powel, M. Cobain, B. Singer, B. Mc Ewen, J. Lindon, J. Nicholson y E. Holmes. 2007. "Mobonomic studies on the physiological effects of acute and cronic physiological stress in sprague. Dawley Rats". *Journal of Proteone Research* 6:2080-2093.

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

Van de bergh, Mulder, B.R., Mennes, E.J. y Glover, V.. 2005. Antenatal maternal anxiety and stress and the neurobehavioural development of the fetus and child: links and possible mechanisms. A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 29: 237-258.

Vigas, M.. 1980. Contribution to the understanding of the stress concept in Catecholamines and stress: recent advance. Usdin, E.; Kvetnansky, R. and I.J. Kopin (Eds.) Elsevier North. Holland. New York. Pp 573.

Von Eckardstein, A., M. Hersberger y L. Rohrer. 2005. "Current understanding of the metabolism and biological actions of HDL". *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care.* 8:147-152.

Waddington CH. 1941. The pupal contraction as an epigenetic crisis in *Drosophila*. *Proc zool Soc Lond A*; 111: 181-8.

Weaver I. C. G., Meaney M. J. et al., 2004. Epigenetic programming by maternal behaviour. *Nature Neuroscience.* 7 (8): 1-8.

- Wei, Y., Chen, K., Whaley-Connell, A.T., y col.. 2007.** Skeletal muscle insulin resistance: role of inflammatory cytokines and reactive oxygen species. *Am J Physiol Regul Integr Com Physiol.*;19.
- Weinstock, Marta. 2008.** The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 32: 1073-1086.
- Weyer, C., Bogardus, C, Mott, D.M., Partley, R.E.. 1999.** The natural history of insulin secretory dysfunction and insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *J Clin Invest*; 104: 787-94.
- Wisborg, K., Barklin, A., Hedegaard, M., Henriksen, T.B. 2008.** Psychological stress during pregnancy and stillbirth: prospective study. *BJOG.* Jun;115 (7):882-5.
- Yamada, F., Inque, S. y Saitoh, T.. 1993.** Glucoregulatory hormones in the immobilization stress induce increase of plasma glucosa in fasted and fed rats. *Endocrinology.* 132: 2199-2205.
- Young, DS. 1990.** Effects of drugs on clinical laboratory test. AACC Press, 3rd ed.
- Zubilite, M. 2007.** Effect of maternal stress on the progeny. *Psicofarmacología.* 7:45.