



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

**MAESTRÍA EN ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA  
VETERINARIA**

**PROYECTO DE TESIS DE MAESTRÍA  
Lic. Prof. Emiliano Sosa**

*Respuestas fisiológicas del músculo esquelético  
e hígado en ratas adultas estresadas  
prenatalmente, expuestas a estrés agudo por  
nado forzado.*

Director: Dra. María Cristina ROMANINI

Co-Director: Dra. Nancy RODRIGUEZ

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia: mi madre Ángela, mi padre José y hermano Agustín, que con su apoyo incondicional; tanto afectivo, material como moral, construyeron en mi la pasión por el estudio y la formación académica constante, como herramienta de progreso humano y personal.

A la mujer de mi vida, Ana, que con su ternura, paciencia y fortaleza me ayudaron en el momento más duro; y lo sigue haciendo, enseñándome a nunca bajar. Pero por sobre todo, gracias hermosa por permitirme formar lo más valioso que una persona puede tener, una familia. A nuestra hija Helena, que con sus “pataditas” dentro de la pancita, ya es la luz preciosa que ilumina nuestras vidas.

A mi colega y profesor, Guillermo Huck, que a pesar de nuestras diferencias y discusiones siempre para construir y mejorar; pero también un objetivo mutuo mancomunado, el crecimiento disciplinar de nuestra ciencias del entrenamiento; fue uno de los pioneros que referenció mis aspiraciones profesionales y la transparencia con la que debo manejarme; quien allanó el camino en esta formación académica.

A la Universidad Nacional de Río Cuarto, estandarte de la educación pública, gratuita, laica e inclusiva, que con su calidad magnánima y de excelencia, me incentivan a cuidar, cultivar y defender con pasión, día tras día; tanto dentro como fuera de ella, en estos tiempos donde las aspiraciones individualistas, superfluas y sin memoria colectiva; debemos combatir.

RESUMEN.....	4
I. INTRODUCCIÓN .....	7
I.1 ESTRÉS .....	8
I.1.1 Tipos de estrés .....	12
I.1.2 Test por nado forzado.....	18
I.1.3 Rol del sistema neuroendocrino .....	19
I.1.4. Mecanismos de acción de los corticosteroides.....	26
I.1.5. Respuestas neuroendocrinas al estrés prenatal.....	29
II. HIPÓTESIS.....	45
III. OBJETIVO GENERAL .....	45
III.1 Objetivos específicos .....	45
IV. MATERIAL Y METODOS .....	46
IV.1 Obtención de los animales de experimentación .....	46
IV.2 Estrés prenatal.....	46
IV.3 Estrés postnatal.....	47
IV.4 Diseño experimental.....	47
IV.4.1. Esquema diseño experimental .....	48
IV.5. Determinación de la COR por RIA .....	50
IV.5.1. Reactivos del análisis.....	50
IV.5.2 Procedimiento .....	51
IV.6. Determinación de la glucemia.....	52
IV.6.1 Extracción de las glándulas adrenales .....	53
IV.6.1.1. Materiales .....	53
IV.6.2. Procedimiento .....	53
IV.7. Determinación de la concentración de MDA .....	53
IV.8. Análisis estadístico .....	55
V. RESULTADOS.....	56
V.1. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles plasmáticos de corticosterona en condiciones basales y luego de un estrés agudo por nado forzado.....	56
V.2 Efecto del estrés prenatal sobre el índice adrenosomático .....	57
V.3 Efecto del estrés prenatal sobre la glucemia, en condiciones basales y luego de un estrés agudo por nado forzado postnatal.....	58
V.4 Efectos del estrés prenatal y nado postnatal sobre la concentración de MDA en hígado, en crías machos.....	59
V.5 Efectos del estrés prenatal y nado postnatal sobre la concentración de MDA en músculo estriado en crías machos .....	60
VI. DISCUSIONES .....	61
VII. CONCLUSIONES.....	70
VIII. PERSPECTIVAS.....	71
IX. BIBLIOGRAFIA.....	72

## RESUMEN

Frente al incremento de factores estresantes durante los últimos años, el estudio de las consecuencias fisiológicas del estrés sobre el organismo cobró gran interés como objeto de investigación científica en diversas áreas y disciplinas científicas, tanto en la medicina del crecimiento y desarrollo, la fisiopatología de diversos trastornos neuroendocrinos. En este sentido el estrés prenatal, juega un papel determinante en la gestación de los mamíferos, ya que el estrés provocado a una hembra en gestación induce cambios físicos, biológicos y psicológicos, provocando disturbios adaptativos en la vida postnatal. El objetivo del presente estudio, fue analizar los efectos y respuestas fisiológicas en músculo esquelético e hígado luego de una exposición a un estrés agudo por nado forzado, en ratas adultas estresadas prenatalmente. Para ello, se estudió la actividad del eje hipotálamo hipofisario adrenal (HHA), del sistema nervioso central (SNS) y su efecto en el estrés oxidativo del hígado y músculo estriado voluntario. Se utilizaron ratas Wistar macho, adultas, estresadas prenatalmente, en condiciones estándar de bioterio. Se estudiaron los niveles de corticosterona (COR), glucemia, malondialdehído (MDA) y el tamaño de las glándulas suprarrenales. Los resultados muestran que en condiciones basales los niveles de COR y glucemia se ven aumentados en las ratas estresadas prenatalmente con respecto a las ratas sin estrés prenatal. Luego de una exposición aguda al nado forzado hasta el agotamiento, la COR aumenta significativamente en el grupo con estrés prenatal, y también se observa este fenómeno en el grupo control, pero alcanzando valores menores; mientras que la glucemia alcanza valores similares en los dos grupos, desapareciendo las diferencias observadas entre los controles y el estrés prenatal, en reposo. Los valores de MDA hepático, en reposo, muestran un notorio aumento en ratas con estrés prenatal con respecto a sus pares controles, diferencia que se sostiene a pesar del estrés por nado forzado. Por otra parte, los valores de MDA en músculo estriado, muestran un notorio aumento en condiciones basales en los grupos con estrés prenatal. Luego del estrés postnatal por nado forzado se observa un aumento significativo de MDA en los grupos controles sin estrés prenatal, fenómeno que no sucede en los grupos con estrés prenatal. En conclusión, el estrés prenatal por IMO provoca una modificación en la regulación del eje HHA, reflejado en los altos niveles basales de la COR plasmática y una hiperglucemia basal; además de una hipersensibilidad a estresores agudos sucedidos en la vida postnatal, manifestado en la mayor secreción de COR luego del estrés por nado forzado. Por otro lado el estrés prenatal es desencadenante de altos niveles de estrés oxidativo en el hígado, vislumbrado en altos niveles de MDA; mientras

que el nado forzado hasta el agotamiento genera altos niveles de estrés oxidativo en el músculo estriado voluntario en ambos grupos.

## ABSTRACT

Due to the increment of stressful factors during the last couple of years, the study of physiological stress consequences over the body called the attention as a research object of study in many scientific areas and disciplines such as growth and developmental medicine, the physiopathology of various endocrine disorders. In this sense, prenatal stress has a crucial role in the gestation of mammals since the stress in a female may cause physical, biological and psychological changes, leading to adaptive control disturbances during life after birth. The aim of this study was to analyze the effects and physiological answers in bone muscle and liver after being exposed to acute stress by forced swimming in adult rats which had been stressed before birth. With this objective, the activity of the Adrenal Pituitary Hipotalamic axis and the Central Nervous System were analyzed. It was also necessary to analyze the effect of the activity in the oxidative stress of the liver and of the voluntary striated muscle. Prenatal stressed, adult, male Wistar rats, in bioterium standar conditions were used. Corticosterone, glycemia, malondialdehido levels and the size of the adrenal glands were studied. The results show that in basal conditions, the corticosterone and glycemia levels are increased in the prenatal stress rats compared to the rats which are not stressed before birth. After an acute exposition to forced swimming to the point of exhaustion, the corticosterone levels remain increased in the stressed prenatal groups, while the glycemia levels reach similar values in both groups and the basal differences disappear. The values of Hepatic MDA, in a state of no activity, show a notorious increase in prenatal stressed rats compared to the group of control. This difference remains in spite of the stress caused by the forced swimming. However, the MDA values in the voluntary striated muscle show increase in basal conditions in the stressed prenatal groups. This difference diminishes after the stress caused by forced swimming, since the control groups show a high increase in the values of muscular MDS after the forced swimming. This phenomenon is not perceived in the stressed prenatal groups. To conclude, the prenatal stressed by IMO causes changes in the regulation of the Adrenal Pituitary Hipotalamic axis and this is perceived, on the one hand, in the high basal levels of plasmatic corticosterone and basal hyperglycemia. Moreover, on the other hand, this is perceived in the hypersensibility to acute stressors during the after birth life, manifested in a greater corticosterone discharge after forced swimming. The prenatal stressed is the trigger of high oxidative stress levels in the liver, perceived in the high MDA

levels; whereas the forced swimming generates high voluntary striated muscle oxidative stress levels in both groups, with a greater increase in stressed prenatal groups.

## I. INTRODUCCIÓN

Frente al incremento de factores estresantes durante los últimos años, el estudio de las consecuencias fisiológicas del estrés sobre el organismo cobró gran interés como objeto de investigación científica en diversas áreas y disciplinas científicas, tanto en la medicina del crecimiento y desarrollo, la fisiopatología de diversos trastornos neuroendocrinos; como en el estudio de la longevidad y envejecimiento del ser humano, fenómeno complejo en el que influyen factores genéticos, como así también ambientales.

En el transcurso de los últimos años, se han publicado varios artículos que muestran la influencia del estrés prenatal y su efecto en el medio intrauterino. Los estudios realizados en humanos revelan que los hijos de madres que sufrieron condiciones adversas durante el tercer trimestre de embarazo presentan consecuencias a largo plazo, tales como malformaciones del corazón, pérdida de la audición, anormalidades esqueléticas y bajo peso al nacer (Ascensão y col., 2007).

En este sentido el estrés prenatal, juega un papel determinante en la gestación de los mamíferos, provocando cambios físicos, biológicos y psicológicos; generando una influencia sobre el desarrollo de las crías, disturbios adaptativos en la vida postnatal, que se ven reflejados en diversas manifestaciones fisiopatológicas (Weinstock, 2001). En el hombre el estrés prenatal puede inducir a retardo mental y disturbios del sueño en el niño, una mayor propensión al consumo de drogas, alteraciones en la función sexual, aumento de la propensión hacia el déficit de atención con hiperactividad e hiperansiedad. En ratas produce disminución del peso corporal, altera el eje HHA, la madurez sexual en los machos y el desarrollo inmunológico. Estas condiciones adversas o estresores sufridas en el periodo prenatal, determinan el epigenoma de las crías; entendiendo al mismo como la interacción de factores genéticos con factores ambientales, ya sea en los periodos pre, peri y/o post natal (Nepomnaschy y col., 2006). En los seres humanos y en los animales, el estrés aplicado a las hembras gestantes reprograma el eje HHA de la cría estresada prenatalmente (EP), generando la hiperactividad de este eje en el estado adulto. Esta hiperactividad se refleja mediante altas y prolongadas concentraciones plasmáticas de corticosterona (COR) en los roedores y de cortisol en los humanos (Mayer y col., 2010). El estrés durante la gestación sensibiliza no solo, al eje HHA de las crías, sino también el eje Hipotálamo-Hipofisario-Gonadal (HHG), lo cual repercute en la madurez sexual de las mismas (Chen Cárdenas y col., 2013; Rodríguez y col., 2007). Existe evidencia que indica que estos cambios neuroendocrinos, generan condiciones metabólicas “*in útero*” que

establecen patrones fisiológicos y estructurales a largo plazo, programando la salud durante la vida adulta (Vieau y World, 2011).

Los estudios de Barker (1992), establecieron que la prevalencia de algunas enfermedades en el adulto, como aterosclerosis, hipertensión arterial (HTA), accidente cerebrovascular, diabetes mellitus tipo 2 y dislipidemias; se relacionaban directamente con el ambiente intrauterino.

Por otra parte, se ha comprobado que el estrés prolongado tiene una correlación directa con el estrés oxidativo (EO) a nivel celular (Quintanar-Escorza y Calderón-Salinas, 2009). El EO se ha asociado a la aparición y desarrollo de diversas enfermedades y procesos crónicos, la diabetes, la obesidad y las enfermedades cardiovasculares, incluyendo la arteriosclerosis; todos ellos considerados actualmente como patologías crónicas no transmisibles con alta frecuencia en los seres humanos. Estudios recientes demuestran el efecto múltiple del desequilibrio en la producción de radicales libres (RL) y su neutralización; ya sea en el envejecimiento de la especie, la infertilidad masculina por daño del ADN espermático, formación de células neoplásicas, diabetes, nefropatías, cirrosis y esteatosis hepática, y en un sin número de patologías inflamatorias/degenerativas: desmielinización, distrofias musculares, amiloidosis, colagenosis del aparato locomotor, miocardiopatías y afecciones al aparato respiratorio. El EO es producido como consecuencia de la respiración celular en los organismo dependiente de las reacciones redox, y es nocivo en términos biológicos cuando la producción de RL supera a los mecanismos antioxidantes endógenos. La vida media de los RL es muy corta, y por lo tanto su cuantificación directa no es posible, por este motivo se utilizan marcadores indirectos de sus efectos. Para el estudio de la peroxidación lipídica los marcadores más utilizados son el MDA y las sustancias reactivas del ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Arquer y col., 2010).

## ***1.1 ESTRÉS***

El término “*estrés*” se ha popularizado a pesar que su definición no está claramente definida. Al realizar una revisión de diversos trabajos y estudios dedicados al tema en incumbencia, se encuentran multitud de definiciones, algunas de las cuales lo abordan indistintamente desde la perspectiva del estrés como estímulo, respuesta y otros incluyen hasta las consecuencias. Sabemos que las variaciones fisiológicas que se dan lugar en un organismo producto de un agente estresante, desencadenan respuestas fisiológicas de ajustes a corto (estrés agudo) o a largo plazo (estrés crónico) que permite al organismo alcanzar niveles de adaptación. Cuando no se logra esta homeostasis, se desarrolla una

adaptación patológica, llamado distrés. Cannon (1929), fue el primero en establecer el vínculo directo entre la actividad emocional y la función del sistema nervioso simpático al escribir la “Teoría emergente de la emoción” (Fernandez Martinez E., 2009).

Por otra parte, quien desarrollo el concepto de adaptaciones positivas o negativas a un estrés, fue Hans Selye. Selye (1950) propuso la teoría general de adaptación a un agente estresante, definiendo al estrés desde el punto de vista de respuestas y consecuencias fisiológicas; mencionándolo como el síndrome o conjunto de reacciones fisiológicas no específicas del organismo a diferentes agentes nocivos del ambiente, de naturaleza física o química, provocando un aumento de la tasa metabólica basal (Stepanian, 2016). Esta teoría describe que ante un estrés existe una primera etapa de respuesta, llamada respuesta rápida, donde se produce la liberación de catecolaminas, noradrenalina (NA) y adrenalina (A); una segunda etapa o respuesta lenta mediada por la liberación de corticoides; y una tercera etapa de agotamiento y muerte. A la respuesta adaptativa al estresante (eustrés) le sigue la reinstauración del equilibrio homeostático normal. Si la respuesta del organismo no logra reequilibrar el funcionamiento normal preestablecido, se produce una respuesta desadaptada. Esta adaptación negativa resulta en un nuevo estado de equilibrio que, pese a ser estable, se desvía significativamente de los valores estándares neurobiológicos. A este equilibrio nuevo y anormal, se lo denomina alostasis, es decir un conjunto de respuestas activadas ante un agente estresante; que implica la activación del sistema nervioso autónomo simpático y el HHA; siendo sus principales mediadores las catecolaminas (A y NA), y las hormonas (COR); que no logran bajar a niveles normales sino que permanecen elevados de manera crónica.

Estos cambios neurohormonales se manifiestan ante la exposición a agentes estresantes agudos, como crónicos (Mc Ewen, 2000). Los altos niveles de NA y A, elevados de manera crónica y permanente, configurada como una forma de adaptación alostática; parece relacionarse con la hipercolesterolemia, el aumento de lipoproteínas de baja densidad (LDL) sobre las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y la hipertrigliceridemia. Todos estos biomarcadores son considerados como factores de riesgo cardiovascular e indicadores de estrés oxidativo.

En otras palabras, estas respuestas fisiológicas son inespecíficas (conllevan consecuencias sobre muchos órganos, sin selectividad), ante diversos agentes que pueden actuar sobre el organismo, ya sea del tipo psicológico como físicos. Se condiciona así una alarma orgánica que actúa sobre el sistema nervioso, cardiovascular, endocrino, e inmunológico, provocando un desequilibrio psicofísico y el consecuente condicionamiento de la posible enfermedad (Selye, 1950).

Por otro lado, los estresores pueden categorizarse en físicos, los cuales han sido definidos como los desafíos externos a la homeostasis; y los psicológicos, como la anticipación, justificada o no, de una serie de respuestas neurales que provocan un desequilibrio en los circuitos del SNC del encéfalo. Una definición integrada establece que el estrés es una cascada de acontecimientos, que consta de un estímulo (estresor), que produce una reacción en el cerebro (la percepción del estrés y la evaluación del mismo), que a su vez activa los sistemas fisiológicos de lucha o huida en el organismo (respuesta al estrés) (Dhabhar y McEwen, 2007).

La respuesta al estrés es la respuesta del organismo a agentes reales o simbólicamente nocivos para su integridad, de lo cual surge que el estímulo estresante puede ser de naturaleza tanto física como psicológica e incluso mixta. Estas respuestas inespecíficas son inducidas por agentes estresantes (inmovilización, ruido, temperaturas extremas, ejercicio físico, etc.) y son independientes de la naturaleza del estímulo que las provoca (Vigas, 1980; De Nicola, 2015).

Para el estudio del estrés, se recurre con frecuencia al uso de modelos animales que ilustren mecanismos psicopatológicos para estudiar el comportamiento de los seres humanos, siendo las ratas uno de los modelos más empleados para éstos estudios (Gómez y col., 2002). En este sentido, en modelos animales, se ha comprobado que el estrés severo crónico produce atrofia del hipocampo y la corteza prefrontal, e hipertrofia de la amígdala lateral (Botelho de Oliveira y Conde, 2011). Estas alteraciones morfológicas se acompañan de deterioro en la memoria, el aprendizaje y el procesamiento emocional de los estímulos sensoriales y pueden constituirse en modelos de depresión inducidos por la persistencia del estrés; e inclusive se la podría llegar a considerar como un proceso relacionado a aquellas patologías neurodegenerativas padecidas por los seres humanos, como el mal de Alzheimer.

Es importante entender que de la única manera que un factor estresante pueda afectar al organismo y su bio-funcionamiento es mediante la inducción de cambios biológicos. Por lo tanto, los estudios de las respuestas fisiológicas al estrés, forma parte del sostén esencial para la comprensión biológica de este fenómeno, las adaptaciones o desadaptaciones al mismo y las consecuencias en la salud del organismo (Dhabhar y McEwen, 2001).

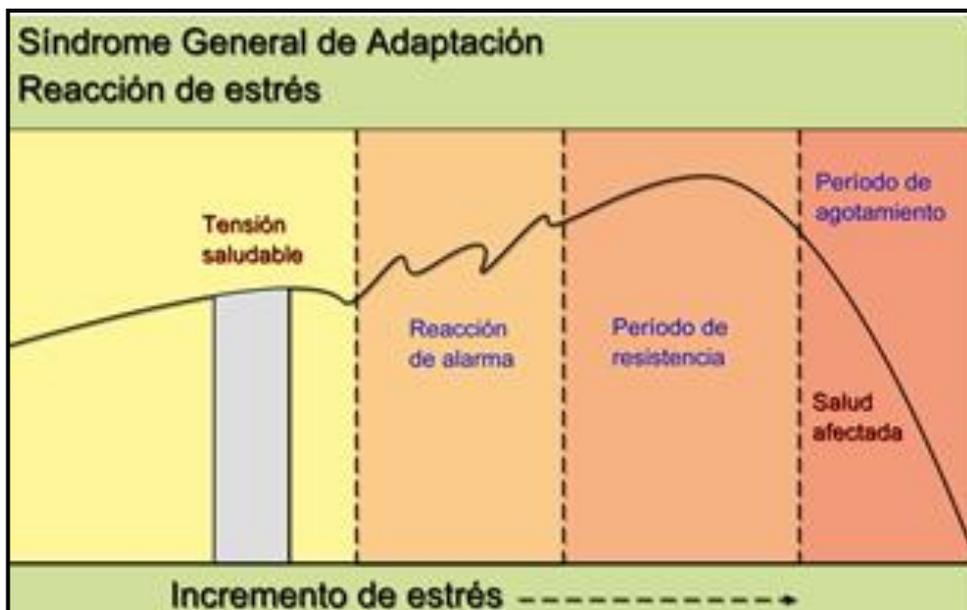


Fig. 1: Fases de las respuestas sistémicas generales ante la exposición a un determinado agente estresante. Adaptado de Cannon (1929).

Otra característica importante de una respuesta al estrés, es su intensidad. La misma puede ser medida por los niveles pico de las hormonas del estrés, los neurotransmisores, y otros cambios fisiológicos, tales como, la distribución y función de las células inmunes, el aumento de la frecuencia cardíaca, la presión arterial, entre otros. Por otro lado, el tiempo durante el cual estos cambios persisten durante el estrés y tras el cese del mismo cobra fundamental importancia (Santos y Perdue, 2000). Se debe considerar que varios de ellos tienen ambos componentes, aunque predomine uno. Hay que tener en cuenta, al estudiar una situación de estrés, no solo el agente estresante, sino múltiples factores que influyen sobre las reacciones fisiológicas del individuo como son: preparación, sexo, estado emocional, y otros condicionantes (Dhabhar y Mc Ewen, 2007).

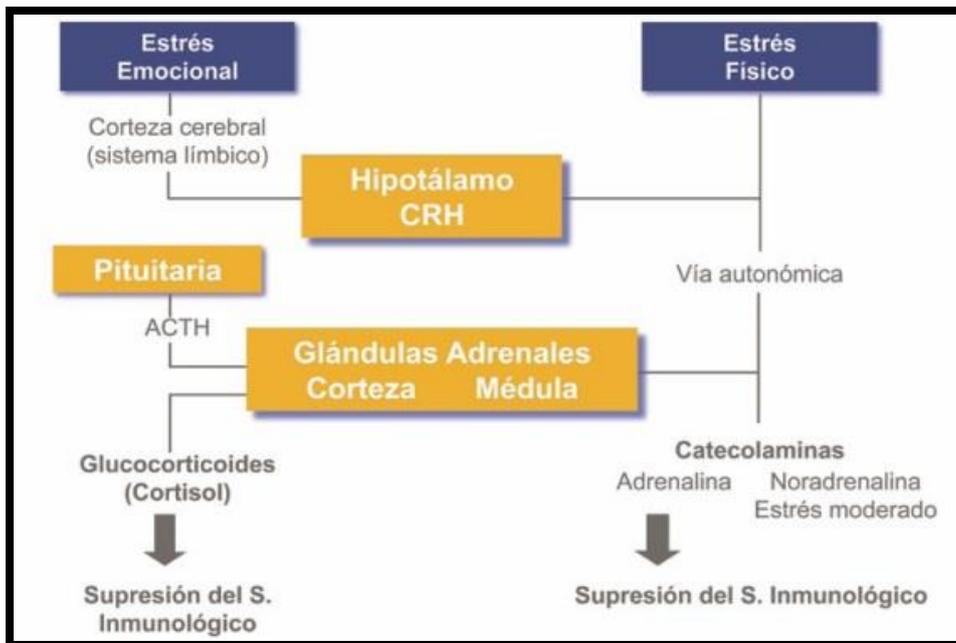


Fig. 2: Efectos del estrés, emocional y físico, sobre el eje HHA (Mc Ewen, 2000).

Los mecanismos de adaptación son básicamente los mismos que hace millones de años. Las tensiones y amenazas de la vida moderna generan cambios que, aun cuando puedan permitir una razonable eficacia frente a las situaciones estresantes, pueden generar una deuda, un precio que más tarde o más temprano se pagará con salud. Es decir que cada situación que pone en juego la homeostasis tiene la probabilidad de dejar una carga residual llamada carga alostática, suponiendo un acecho para nuestra salud. Genotipo y fenotipo, juegan un papel importante en el establecimiento de las diferencias individuales en la respuesta psicofisiológica al estrés y en los efectos que la respuesta puede tener en un organismo.

### 1.1.1 Tipos de estrés

El estrés puede ser perjudicial cuando es crónico o de larga duración, ya que en muchos trabajos de investigación, se ha observado que deprime la respuesta inmune, fundamentalmente celular. Sin embargo, a menudo, la respuesta al estrés agudo tiene efectos de adaptación saludables en el corto plazo. Por lo tanto, la principal característica distintiva del estrés, en términos de sus efectos biológicos, es la duración en la que persisten esos cambios fisiológicos y la consecuente elevación de la respuesta fisiológica al estrés; y sobre todo el tiempo en que tardan esos valores en regresar a rangos estándares (Sapolsky, 2004).

El estrés agudo se ha definido como el estrés que dura por un período de minutos u horas, y el estrés crónico como el estrés que persiste durante varias horas al día durante

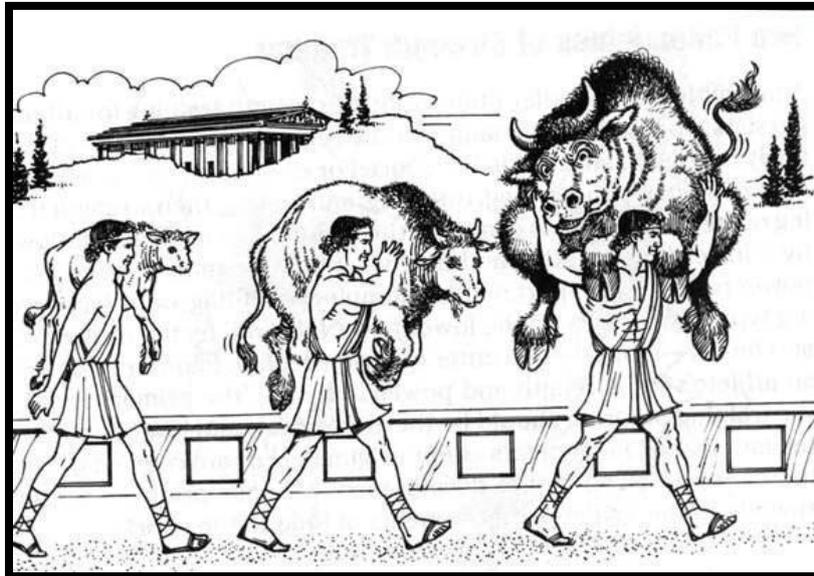
semanas o meses. Para la mayoría de los organismos, incluidos los seres humanos, la vida se compone de una serie de respuestas repetidas ante agentes estresantes del tipo agudo que se producen a diferentes frecuencias y con diferentes duraciones. Es importante reconocer que la exposición repetida al estrés agudo no es necesariamente perjudicial, siempre y cuando los mediadores fisiológicos que se elevan durante el estrés, retornen a los niveles de referencia y reposo inmediatamente después del cese del mismo. Además, es importante que la frecuencia y/o la duración de la respuesta al estrés no sea tal, que resulte en un aumento constante de las hormonas y los neurotransmisores (Dhabhar y col., 1993; Moya Albiol y Salvador, 2007). Hablar de estrés crónico es hablar de alteraciones sufridas en los mecanismos adaptativos que el organismo presenta frente a agresiones externas, y en el estrés agudo existen evidencias de una estimulación hiperadrenérgica y de un aumento del tono hipotálamo-hipófiso-suprarrenal (glucocorticoides y andrógenos) (Cambra, 2009).

El estrés crónico puede ser de orden continuo o intermitente. En el primero, el organismo es expuesto ininterrumpidamente a un estrés durante días o semanas; mientras que el intermitente los animales son diariamente expuestos a estímulos estresantes durante semanas, con un tiempo determinado que puede durar minutos y hasta horas. Un ejemplo de estrés crónico continuo es la exposición a ciertas situaciones de estrés social, observado en monos como en roedores, donde se puede ver el aumento de la conducta agresiva en machos ante la presencia de hembras. Un ejemplo de estrés crónico intermitente, puede ser la exposición al frío, la inmovilización en tabla (IMO), el nado forzado, el choque eléctrico, entre otros (Bahamondes, 2011; Moscoso, 2009).

Existen múltiples estímulos estresantes que se utilizan en la experimentación animal, entre ellos, la inmovilización en plancha el choque eléctrico bajo diversos planes de descarga los estímulos sociales (aumentos en la densidad de la población) (Weinstock y col., 1998), agentes estresantes como luz, sonido, temperaturas extremas, incluso anestésicos como el éter (Moscoso, 2010).

El ejercicio físico representa en sí mismo, un modelo de estrés psicofísico, un agente que perturba la homeostasis del organismo, donde su dosificación (sistematización óptima de su aplicación), es la que contribuye a generar adaptaciones positivas (aumento de los niveles de sustratos energéticos, renovación de proteínas contráctiles y enzimas, optimización en los procesos de respiración celular, disminución del gasto cardíaco en reposo, entre otros) o adaptaciones negativas, fatiga y muerte celular, como las descritas en procesos de desadaptación ante agentes distresantes. El hecho de que un ejercicio físico conduzca a cambios funcionales del organismo, es un fenómeno conocido por la

humanidad desde hace tiempo. En la edad antigua, ha sido popularizada la historia del atleta olímpico griego, Milón de Crotona; donde se narra el suceso del progreso exponencial de su fuerza y masa muscular del sujeto, a medida que sometía a su cuerpo a un estrés de sobrecarga, levantando un ternero desde la etapa infantil-juvenil hasta la adultez, donde el mismo ternero crecía en peso día a día.



*Fig. 3: Ejemplificación de las adaptaciones positivas ante un determinado estresor (Grupo de Estudio 757, 2014).*

Sin embargo, el abordaje científico de tales modificaciones por el ejercicio ha sido más reciente. Estudios científicos realizados tanto en humanos como en animales de experimentación parecen indicar que la influencia del ejercicio físico sobre el organismo está condicionada por la duración e intensidad del esfuerzo a realizar, así como por el estado fisiológico previo de quien lo realiza, donde son evidentes las potencialidades genéticas de cada individuo. Hay una serie de autores, que defienden la idea de que el ejercicio moderado, regular, incrementa la resistencia a infecciones, mientras que un ejercicio intenso o el sobre entrenamiento que soportan muchos deportistas, parece estar asociado con una mayor susceptibilidad a infecciones (Aguilar y col., 2006). Existen numerosos datos en la bibliografía que muestran que el ejercicio físico intenso, en diversas modalidades: nado (Levay y col., 2006) o carrera en tapiz rodante (Ferry y col., 1990), provoca cambios en neurotransmisores (catecolaminas) y hormonas (cortisol y péptidos opioides), conocidos moduladores de la función inmune (Walsh y col., 2011). Algunos protocolos de ejercicio físico intenso, ya sea de carácter continuo como intermitente; por encima del 70% del consumo máximo de oxígeno ( $VO_{2max}$ ), genera un fuerte impacto simpático mimético, aumentando los valores de catecolaminas, en

primeras instancias NA y luego A. Además, se generan las condiciones para la secreción de cortisol, provocando una mayor movilización de sustratos energéticos en el momento de ejecución del ejercicio, tanto sea lipólisis en el interior del adipocito, la glucólisis en las células musculares o a nivel hepático (Willmore y col., 2017; Katch, 2017).

El ejercicio físico intenso extenuante (nado forzado), es un importante factor estresante cuyos efectos dependen del tipo, intensidad y duración de la actividad. Se ha demostrado que la realización de ejercicio físico agudo ejerce efectos sobre algunos parámetros fisiológicos, como la concentración de lípidos sanguíneos, colesterol, gasto cardíaco, presión arterial, metabolismo glucídico a corto plazo, y el sistema inmunológico. Estas alteraciones producen ajustes orgánicos tendientes a mantener la homeostasis, entre los cuales se destacan el aumento de la vasodilatación vascular, aumento de la frecuencia cardíaca y respiratoria (ventilación), y las respuestas hormonales. Estos ajustes producen un incremento en la disponibilidad de oxígeno en los órganos y tejidos involucrados en el ejercicio, un aumento del glucagón, disminución de la insulina, aumento de la adrenalina, que directa o indirectamente aumentan la glucemia y la predisposición energética. La disminución de la insulinemia contribuye a aumentar el efecto de las hormonas contrarreguladoras en el hígado, estimulando la movilización de triglicéridos del tejido adiposo y muscular y del glucógeno muscular (Marliss y col., 2000).

Los efectos del ejercicio físico en el organismo dependen de la intensidad, duración, tipo de ejercicio (por ejemplo, ejercicios de fuerza frente a resistencia), aplicación del estímulo (ejercicio agudo vs. ejercicio crónico), y las condiciones fisiológicas previas del sujeto (Barbany, 2002; 2014; Willmore y col., 2017; Katch y col., 2017).

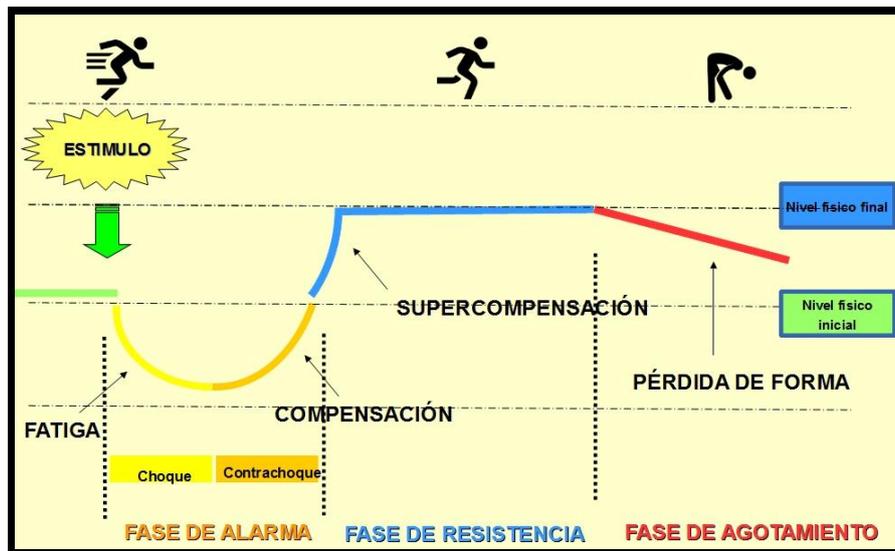


Fig. 4: Respuestas y adaptaciones ante el entrenamiento físico (Suarez, 2014).

Por otro lado, hay evidencia científica que indica que durante el ejercicio los músculos producen y liberan una elevada concentración de citoquinas proinflamatorias. Tanto TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-1ra (antagonista al receptor), IL-10, como los receptores extracelulares del TNF- $\alpha$ ; pueden aumentar drásticamente sus niveles, durante una sesión de ejercicio agudo. Además, se produce un aumento de leucocitos, neutrófilos, linfocitos (incluidos los T, B y células NK), monocitos y concentraciones plasmáticas de proteína C reactiva. Al finalizar el ejercicio intenso, los neutrófilos y los monocitos pueden seguir aumentando en el período de recuperación, mientras que el resto de leucocitos disminuyen su número y las concentraciones plasmáticas de las citocinas mencionadas se mantienen elevadas durante algunas horas más (Lopez Chicharro y Vicente Campos, 2017)

Ejercicios extremos realizados hasta el agotamiento, ya sea del orden aeróbico (maratón), como de la fuerza resistencia (Crossfit®), se relacionan con el sobre entrenamiento, la fatiga, fase de agotamiento del organismo que produce una depresión de la función inmune que puede aumentar la susceptibilidad a infecciones por inmunodepresión. Estos cambios, si bien ejercen una función moduladores de diversas actividades fisiológicas, son generalmente de naturaleza transitoria (Veneroso, 2010; Lopez Chicharro y Fernandez Vaquero, 2017).

Está demostrado que la alta producción de citocinas proinflamatorias, como las nombradas anteriormente, se las asocia a un incremento en el estrés oxidativo celular y viceversa, el estado redox celular modificado, modula las señales de transducción y producción de diversas citocinas, afectando al mantenimiento de la homeostasis y la supervivencia celular. El estrés oxidativo, por tanto, puede estar implicado en la iniciación y propagación de las respuestas inflamatorias.

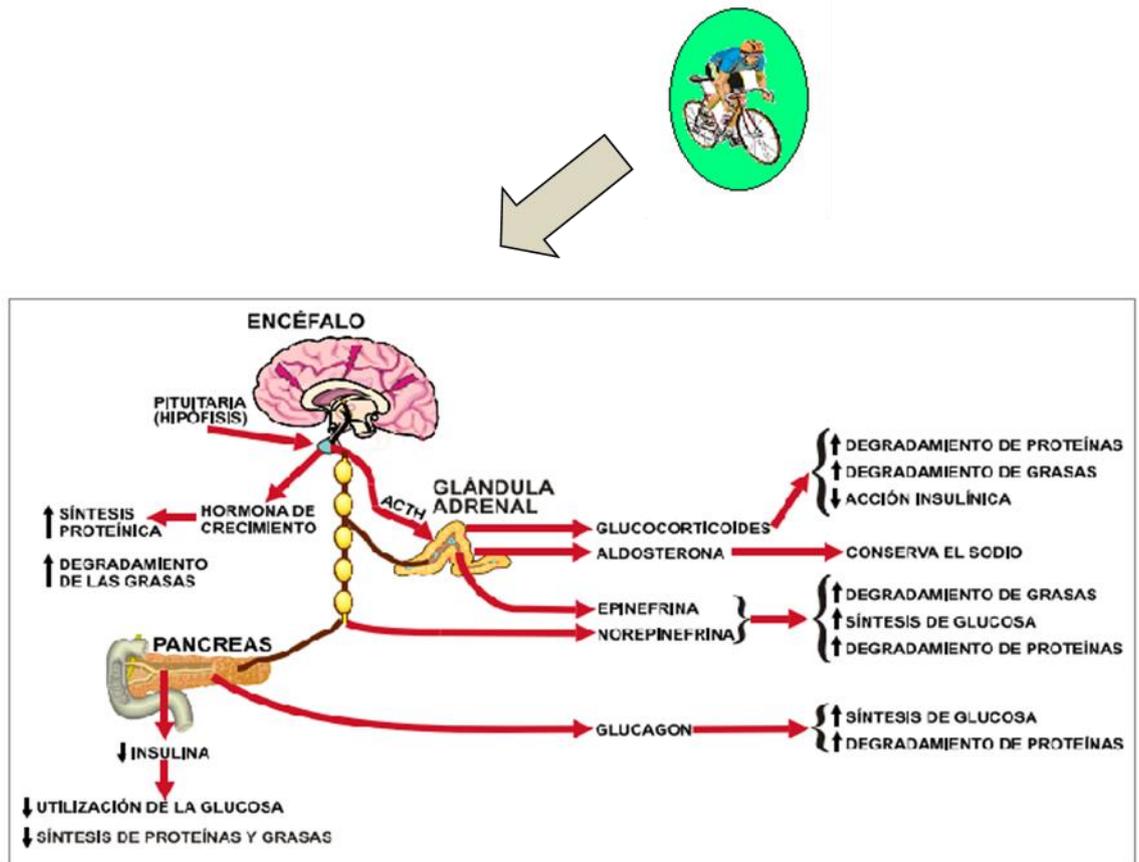


Fig. 5: Efectos del ejercicio físico sobre el eje HHA (Fabrice Duval y col., 2010).

Dentro de los modelos de ejercicio, para el estudio de estrés en animales de laboratorio, se destaca la prueba de nado forzado, descrita por primera por Porsolt y col. (1978), que responde a las características esenciales de lo que sería un estrés por ejercicio físico. Este test es actualmente una de las pruebas más utilizadas para evaluar distintos tipos de tratamiento antidepresivos en modelos animales, motivo original del test. Algunos de los argumentos a su favor como modelo de depresión se fundamentan en el hecho de que incluye la exposición a un estímulo estresor donde el roedor no puede escapar, que induce comportamientos semejantes con algunas manifestaciones depresivas en el humano, llamados comportamientos del tipo ‘desesperanza aprendida’ (Vinaccia y col., 2004), además crea las condiciones neuroendocrinas óptimas de sensibilidad dopaminérgica, para la aplicación posterior de diversos antidepresivos. Es decir, el agotamiento posterior a la fase de respuestas agudas, causado por la fatiga del nado hasta la extenuación (‘sentimiento de desesperanza’), crea un aumento de las enzimas que se encargan de degradar NA, dopamina y serotonina; el transportador de NA (TNE), los transportadores de dopamina (D1, D2, D3 Y D4) de la región amigdalina y el transportador de serotonina (5-HTT). Todos ellos ven aumentadas sus actividades de

degradación de estos neuropéptidos, provocando su alteración y posterior efecto depresivo (Morralla y col., 2017).

### **I.1.2 Test por nado forzado**

El test por nado forzado, fue desarrollado en 1977 por Porsolt, el cual basó su implementación como modelo experimental para el estudio de la depresión y los efectos farmacológicos de diversos antidepresivos (Porsolt y col., 1977). Si bien supuso una aproximación muy importante al trastorno afectivo, la validez de este modelo experimental fue cuestionada por la dudosa fundamentación teórica y por la falta de similitud entre las respuestas inducidas por el nado forzado y las características clínicas de la depresión. Inclusive numerosos autores argumentaron la falta de similitud de las respuestas de las ratas al estrés con la depresión en humanos (Cryan y col., 2002; Benoit y col., 2005;).

El test de nado forzado de Porsolt, modificado por Detke y Lucki (1995), es uno de los test más usados para detectar cambios a nivel neuroendocrino en un sin número de hormonas, citocinas y demás variables fisiológicas: ACTH, COR, NA, A, IL-6, entre otras (Gil, 2007).

El mismo consiste en colocar una rata en un cilindro de 35 cm de altura por 24 cm de diámetro, con un contenido aproximado de 13.5 cm de agua.

El procedimiento se divide en dos partes:

- a) Pre test: exposición al agua con una duración de 15 minutos.
- b) Test: a las 24 hs de transcurridos el pre test, se realiza la exposición directa con una duración de 5 minutos.

Recordando el fin original del test, se observa el comportamiento de la rata entre el momento en que se la coloca sobre la superficie del agua hasta que se quede inmóvil; considerando inmovilidad cuando el animal realiza apenas movimientos mínimos necesarios para mantener la cabeza fuera del agua (Porsolt y col., 1977).

El uso del test para el estudio de variables y parámetros neuroendocrinos, relacionados con el ejercicio físico y entrenamiento, no es del todo conocido, pudiendo ser el trabajo de Huck, uno de los más relevantes; ya que las variables a medir fueron: niveles plasmáticos de COR, tamaño de las adrenales, glucemia, reactividad del sistema inmune, tamaño del bazo, número de células del bazo, cinética de los niveles plasmáticos de COR, cinética del porcentaje % de linfocitos, neutrófilos y de la relación neutrófilo/linfocito (Huck, 2014).



Fig. 6: Consecuencias del ejercicio físico en el metabolismo de los glúcidos (Adaptado de López Chicharro y Fernández Vaquero 2008).

### I.1.3 Rol del sistema neuroendocrino

El conjunto de respuestas ante un estrés determinado da lugar a la liberación de neurotransmisores, hormonas, péptidos y otros factores en la circulación, de forma local, dentro de los tejidos. Los principales mediadores de los efectos del estrés son la NA y A, que son liberadas por el SNS y HHA. Dado que, prácticamente todas las células del cuerpo expresan receptores a uno o más de estos factores, los mediadores relacionados con el estrés pueden inducir cambios en casi todas las células y tejidos, en consecuencia, éstas respuestas generan una advertencia y cambios a nivel sistémico, ante un factor estresante (Lundberg, 2005).

El estrés puede ser cuantificado evaluando diferentes marcadores endógenos, entre los cuales los corticosteroides son los más investigados. Los corticosteroides son esteroides, moléculas orgánicas derivadas del núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno, donde sus acciones determinadas dependen del grupo funcional que posean. Las moléculas esteroides se clasifican en las que mantienen la especie: las sexuales, donde encontramos los andrógenos, estrógenos y progesterona; y las que mantienen al individuo, ya que regulan el metabolismo energético y mineral: los glucocorticoides, mineralcorticoides y la vitamina D. Los corticosteroides biológicamente activos son el cortisol o la corticosterona dependiendo de la especie animal de estudio (Guyton y Hall, 2016).

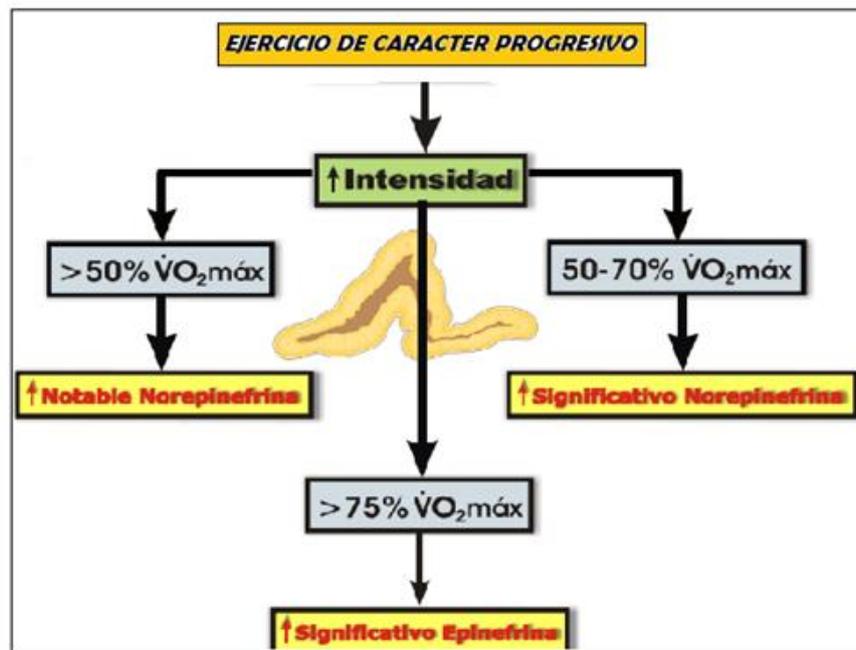


Fig. 7: Efectos en la segregación de catecolaminas según la intensidad del ejercicio físico  
(Adaptado de López Chicharro y col., 2013).

El estímulo adrenérgico, clave en los procesos de respuesta inmediata, se origina en el locus ceruleus talámico para posteriormente por vía neuroendocrina, influir en la médula suprarrenal en la producción de catecolaminas.

El eje HHA empieza a nivel talámico con la secreción de proopiomelanocortina (POMC), precursor de la CRH (hormona liberadora de corticotropina), que a su vez actúa sobre la hormona adrenocorticotropa (ACTH) hipofisaria, que en último término actúa sobre las zonas fasciculada y reticular de la corteza suprarrenal para inducir la secreción de glucocorticoides y andrógenos (dehidroepiandrosterona [DHEA]). Éstos son probablemente los mediadores clásicos mejores conocidos del estrés. Los glucocorticoides ejercen acciones pleiotrópicas en todo el organismo (hiperglucemia, hipertensión, depresión, catabolismo, etc.) siendo también capaces de controlar independientemente de su efecto inmunosupresor procesos dolorosos en la esclerosis múltiple o en la neuralgia postherpética (Muller y col., 2005).

Existen muchas otras hormonas, habitualmente olvidadas, que en una situación de dolor crónico como modelo de estrés tienen mucha importancia e intervención: vasopresina, oxitocina, GH y IGF-1. Las hormonas de la hipófisis posterior parecen estar más implicadas en procesos agudos, modulando las sinapsis catecolaminérgicas (todos estos ejes están interconectados entre sí) y parecen mediar reacciones agresivas asociadas al estrés.

Cuando sometemos una rata a un proceso de estrés por dolor, existe básicamente una doble activación: el eje adrenérgico (A en caso de una hipoglucemia y NA en caso de frío o formalina) y el eje corticoideo (hemorragia e inmovilización). Cabe señalar las diferentes respuestas hormonales en función de los diferentes estímulos estresantes. En caso que el estrés sea psicofísico (ejercicio físico), la activación de las CA es doble, con los dos neuropeptidos en alza (Correa y col., 2000).

Los sistemas neuroendocrinos involucrados en la respuesta a una situación aversiva o probable desencadenante de estrés, se ocupan primero de medir las características del estresor y deciden la respuesta de afrontamiento de acuerdo con la activación de circuitos pre o neo formados que incluyen fundamentalmente el procesamiento neurobiológico a la situación de amenaza presentando varios niveles. En el caso de un estresor psicofísico motriz, realizado previamente y dosificado coherentemente, origina una fuerte activación del circuito mesolímbico dopaminérgico y corteza prefrontal, quienes son los encargados de mediar las sensaciones de recompensa, planificación rudimentaria de acciones, cálculos de los riesgos e inhibición de los comportamientos inapropiados. Durante el esfuerzo máximo, hasta el agotamiento, se produce una reducción de la oxigenación en las cortezas prefrontal y motora, afectando las funciones ejecutivas y obligando al sujeto a abandonar el ejercicio.

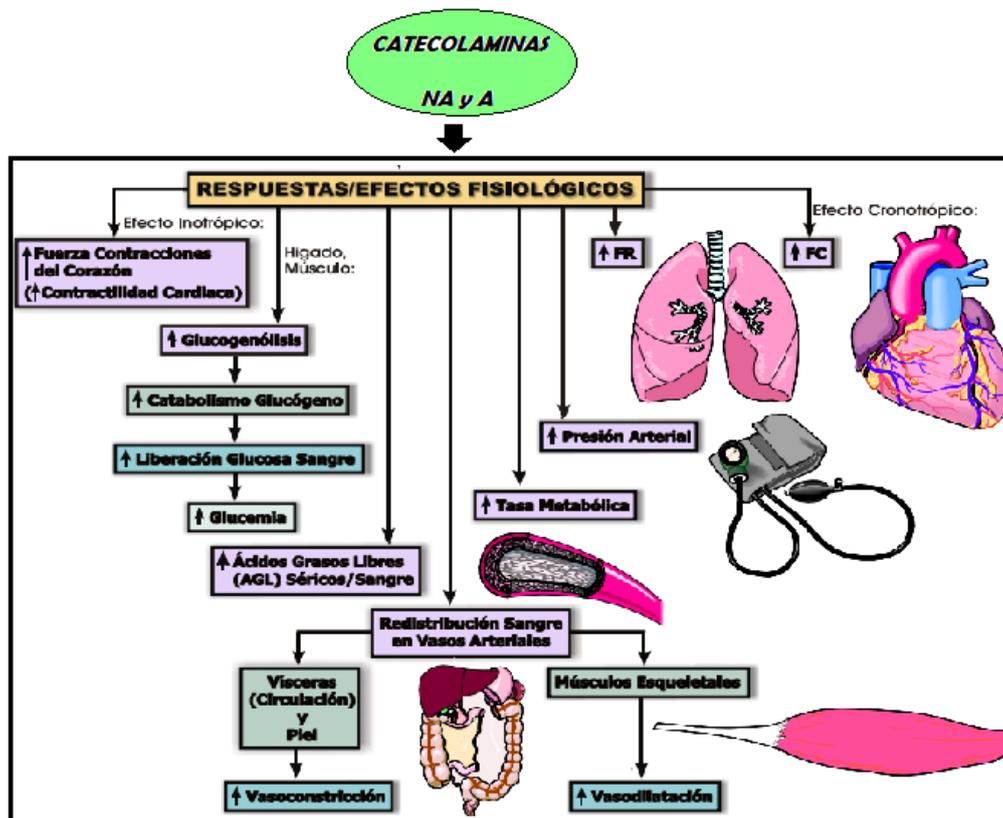


Fig. 8: Efectos sistémicos del incremento en la producción de catecolaminas (Adaptado de Guyton y Hall, 2016).

Históricamente los centros neurales de orden superior que coordinan las repuestas emocionales al estrés, se agruparon bajo la rúbrica de sistema límbico. Sin embargo, se demostró que varias regiones encefálicas fuera del sistema límbico clásico desempeñan un papel fundamental en el procesamiento emocional, incluida la amígdala y varias áreas corticales en las caras orbitaria y medial del lóbulo frontal. Este conjunto de áreas corticales y subcorticales, abarca no solo componentes esenciales del sistema motor visceral sino regiones en el encéfalo anterior y el diencefalo que motivan los pools de neuronas motoras inferiores, vinculadas con la expresión somática de la conducta emocional. Las mismas estructuras encefálicas que procesan las señales emocionales, participan en otras funciones complejas, como la toma racional de decisiones, la interpretación y la expresión de la conducta social.

Las fases neurobiológicas de la respuesta ante el estrés (Amdur y Liberzon, 2001) son:

- a) Un filtro cuanti o cualitativo cuya función se estructura en el talámico
- b) Un procesamiento instintivo conductual que es a nivel amigdalino
- c) Un procesamiento instintivo amnésico a nivel hipocampal
- d) Un procesamiento defensivo autovivencial que es orbitofrontal y singular

La suma algebraica de todos los anteriores produce una serie de reacciones que informan al organismo de un desequilibrio, al cual se debe responder activando diversos mecanismos que den una respuesta. Esas respuestas se pueden resumir en:

- a) Activación en el núcleo para-braquial de la respiración disneica.
- b) Activación de los núcleos trigémino-faciales, que van a producir la expresión facial de miedo.
- c) En los núcleos estriados se desencadena la respuesta de activación motora.
- d) En el hipotálamo lateral y sistema simpático se originan los mecanismos de aumento de la presión de los vasos sanguíneos (hipertensión), taquicardia, sudoración, pilo erección y midriasis.
- e) Y en el sistema parasimpático provoca diarrea, bradicardia, úlceras y micción imperiosa.

Si estos circuitos actúan y se relacionan normalmente, se modula la respuesta al estrés, logrando la adaptación y la posibilidad de decidir cambios adaptativos. Por ende, se puede deducir que el mediador psiconeuroinmunoendócrino más implicado es el eje córtico-límbico-hipotálamo-hipófiso-adrenal (CLHHA), considerado el verdadero sistema de respuesta al afrontamiento, al aprendizaje y a la conducta emocional. Ante la situación aversiva, estrés, se activa el sistema CLHHA con hipersecreción de CRH cuando la respuesta es depresiva, produciendo ansiedad, disminución del apetito por disminución de formación de ácido clorhídrico y del vaciamiento gástrico, agresividad, disminución del sueño y deseo sexual e inmunosupresión. Además, el mismo eje o sistema, conduce a la hipersecreción de la hormona antidiurética (ADH) o vasopresina cuando la respuesta es de hostilidad o agresión. Este último tipo de respuesta predomina en el género masculino donde los núcleos productores de vasopresina son de mayor funcionalidad en el período prenatal. La vasopresina o ADH además de sus funciones sobre el equilibrio hidroelectrolítico, potencia los efectos del CRH sobre la secreción de ACTH. Fisiológicamente el cortisol inhibe la liberación de la vasopresina, mecanismo de regulación negativo que se conserva en el tipo de estrés agudo, pero que se pierde con la exposición sistémica a un estrés del tipo crónico. Consignemos que la vasopresina es considerada una hormona de afrontamiento, lucha o huida, de la misma jerarquía que la CRH, potenciándose recíprocamente de manera clara.

Por último, podemos resumir que los cambios inducidos, dependen de la intensidad y duración del estrés donde, por ejemplo si el estrés es por IMO, las principales modificaciones a nivel del eje HHA son:

- a) Reducción de la ingesta

- b) Disminución de la ganancia de peso corporal
- c) Involución del timo
- d) Hipertrofia adrenal y aumento de la respuesta adrenocortical a la ACTH
- e) Incremento de los niveles basales de COR con niveles normales de ACTH
- f) Aumento en la expresión del gen de la POMC en la hipófisis anterior
- g) Regulación negativa de los receptores de CRH
- h) Incremento en la respuesta al CRH exógeno
- i) Aumento en la expresión de los genes del CRH y AVP en el PVN.
- j) Regulación negativa de los receptores de glucocorticoides tipo II en el hipocampo (Fernández-Castro y Coll Andreu, 2011).

En conjunto, todas estas adaptaciones, parecen demostrar que después de la exposición a estímulos estresantes crónicos; la capacidad potencial de repuesta del eje HHA, esta notablemente incrementada, aunque no se refleja en una mayor actividad basal del mismo. Esta mayor capacidad potencial de respuesta sería necesaria para asegurar la respuesta adecuada del eje, frente a nuevas demandas, representadas por nuevos estímulos estresantes de características y duraciones imprevisibles (Osorio y col., 2008).

Sin embargo, la respuesta hormonal a las situaciones estresantes depende de la variable estudiada y principalmente de la experiencia previa con esa situación estresante. Cuando la exposición se hace de forma intermitente y diaria, la respuesta del eje HHA tiende a reducirse. Esta reducción en la respuesta inicial después de la exposición repetida al mismo estrés podría ser explicada como resultado de la contribución de dos mecanismos diferentes (Fernandez Castro y Coll Andreu, 2011)

Una reducción del impacto emocional producido por la familiarización del animal con el estímulo repetido.

- a) Cambios bioquímicos desencadenados por la exposición continua, como pueden ser, la regulación a la baja de los receptores, un descenso de la liberación de hormonas por agotamiento glandular o un incremento de la potencia de los mecanismos de retroinhibición.

Para comprender y distinguir estas dos posibilidades, se debería dar un cambio en el agente estresor. Si ante el cambio, la reducción de la respuesta del eje HHA fuera sobre todo como consecuencia de la reducción de la reacción emocional frente a esa situación y las capacidades de respuesta del sistema están intactas, se debería esperar una respuesta estándar o normal al nuevo agente (heterotípico). Pero, si la respuesta del eje

HHA al nuevo agente, fuera deficitaria o nula, probablemente sea consecuencia de cambios bioquímicos que están reduciendo la capacidad de respuesta del sistema.

Por último, la habituación y reducción de la repuesta en relación a la exposición repetida a un estresor, parece no reflejarse en todas las variables fisiológicas del eje HHA (Gonzales, 2014).

La reducción progresiva en la secreción hormonal de ACTH, las CA (principalmente A), la prolactina y la glucosa, no coinciden con la respuesta siempre a la alta ante estímulos de elevada intensidad, de la COR y el cortisol pero si se puede observar adaptaciones de los corticosteroides ante estímulos de baja y mediana intensidad. Esta diferencia adaptativa en la respuesta entre ACTH y COR, puede deberse a dos razones:

- a) La saturación de la secreción de la adrenal con niveles relativamente bajos de ACTH, de forma que una reducción en la liberación de ACTH no tiene por qué reflejarse en una reducción de la secreción de COR. (Karst y col., 2010; Velez y col., 2012):
- b) Al aumento de la respuesta adrenocortical a la circulación de ACTH en ratas estresadas crónicamente (Ulrich y col., 2006).

Por lo tanto, a la hora de estudiar la adaptación del eje HHA en respuesta a un estímulo estresante de elevada intensidad, la ACTH es un mejor marcador de adaptación que la COR (Fernandez Castro y Coll Andreu, 2011).

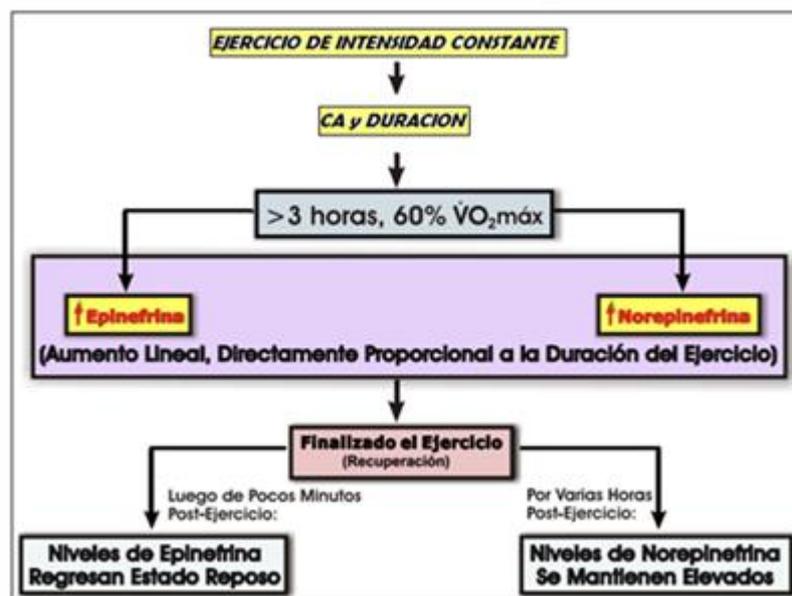


Fig. 9: Comportamiento de las catecolaminas durante un estresor físico y finalizado el mismo (López Chicharro y col., 2008).

#### **I.1.4. Mecanismos de acción de los corticosteroides**

Los altos niveles de corticosteroides inducen a múltiples efectos sistémicos en el organismo. Esta influencia notable de los esteroides en las células, viene dada por una actividad genómica determinada, sobre todo a nivel del sistema nervioso central, por medio de dos receptores: el receptor de glucocorticoides (GR) y los receptores para mineralocorticoides (MR); que difieren entre sí por su localización y afinidad por diferentes ligandos (Rosen y Kelch, 1995; Pujols, 2015). Los GR se localizan a nivel citoplasmático, y una vez unida la hormona con el receptor, se produce un cambio conformacional, y el complejo ligando/receptor se torna activo, permitiéndole unirse a secuencias específicas del ADN en zonas reguladoras y promotoras de los genes denominados CRE (elementos respuesta a corticosteroides); y de esa manera los glucocorticoides controlan la expresión génica, activando o inhibiendo ciertos genes. Los receptores MR, tienen gran afinidad por los mineralocorticoides, como la aldosterona, y se unen principalmente a un glucocorticoide específico como la COR. En cambio, los GR, tienen una alta afinidad por el cortisol y diversos corticosteroides sintéticos, como la dexametasona (Galigniana y col., 2001).

La ubicación de los receptores MR se da en las glándulas salivales, intestino y riñones, mientras que en estructuras neurobiológicas centrales podemos encontrarlos en el hipocampo, septum, amígdala, bulbo olfatorio y regiones de la corteza cerebral.

Por otra parte, los receptores GR tienen una distribución más generalizada, encontrándose grandes cantidades en el sistema límbico, núcleo paraventricular del hipotálamo y regiones monoaminérgicas del tronco encefálico.

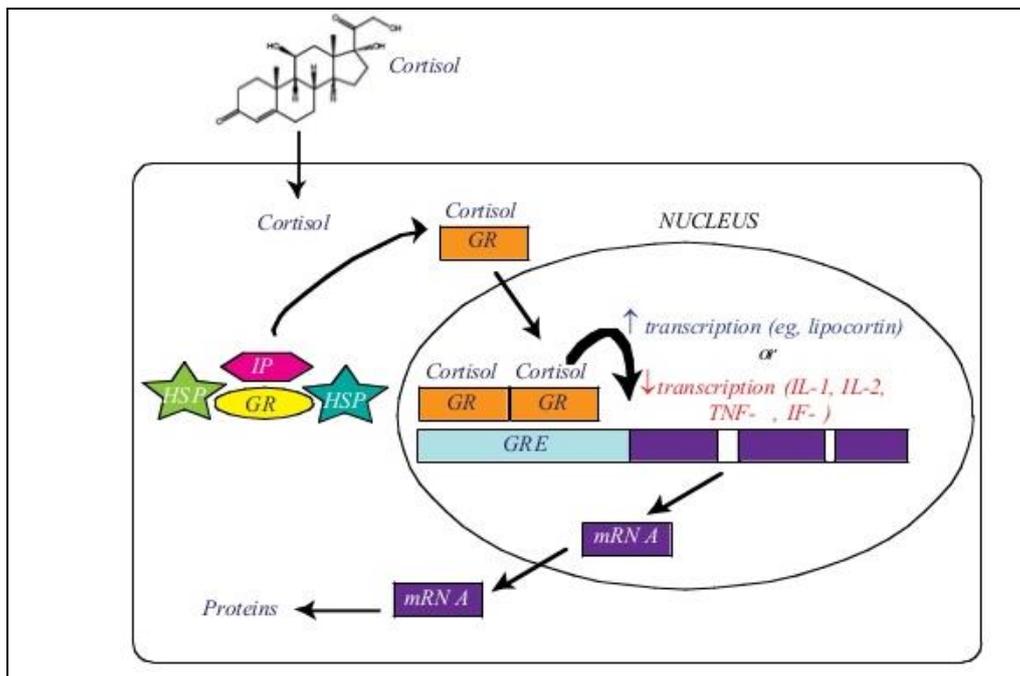


Fig. 10: Mecanismo de acción de los glucocorticoides a nivel intracelular (Newton, 2000).

Las diferentes afinidades de ambos receptores, conforman el procesamiento y la repuesta al estrés, ya que cuando los GR están elevados, como ocurre durante la noche o ante un determinado estrés, los receptores GR son los que se van ocupando; por ello su bloqueo es crucial para la inactivación del eje HHA al estrés. En cambio, los MR cumplen un rol modulador de los niveles basales diurnos de las hormonas secretadas por el eje HHA, ya que son los primeros en ser ocupados en las primeras horas del día. A nivel extra nervioso y sistémico, los receptores para corticosteroides abundan, principalmente el GR, siendo indispensables para el mantenimiento del metabolismo y por ende del organismo (Bertolin y col., 2015).

Además de los mecanismos genómicos, existen vías más rápidas por la que los corticosteroides influyen en las células de un organismo. Estas vías están mediadas por receptores a nivel de la membrana plasmática, pero que no estarían asociados a la entrada de los corticosteroides adentro de la célula. Los mecanismos por los cuales se crean estas condiciones de cambios intracelulares se pueden deber a:

- Cambios en la fluidez de la membrana celular
- Señalización a través de otros receptores de membrana
- Interacción con receptores para neurotransmisores, que permite la entrada de por ejemplo GABA.

De estas tres hipótesis, la de mayor validez y confirmación es que los corticosteroides activan receptores para neurotransmisores, como ocurre con la entrada de GABA en el SNC. Esta regulación fisiológica para los receptores GABA, puede ser muy importante en



### **I.1.5. Respuestas neuroendocrinas al estrés prenatal**

Teniendo en cuenta la interrelación directa entre el feto y la madre, con una actividad crucial de la placenta, todo cambio a nivel neuroendocrino provocado por un estrés ambiental en la madre gestante, influye en el desarrollo neuroendocrino de la cría, mediado por hormonas producidas al momento del estrés recibido por la madre en gestación (León y col., 2010).

Estas condiciones adversas o estresores sufridas por la madre gestante, determinan el epigenoma de las crías, fenómeno basado en tres mecanismos fundamentales:

- a) La interacción materno fetal de la placenta, mecanismo que parece afectar en más de un nivel al desarrollo neurobiológico futuro del feto. Esto se aleja de la visión pasiva de la placenta de ser solo una transportadora de nutrientes, factores de crecimiento y hormonas (Magee y col., 2014).
- b) La relación del sistema nervioso en desarrollo, con los sistemas inmune y endocrino, que juegan un papel de especial importancia durante el desarrollo embrionario en la adaptación al medio por parte del embrión. Esta ventaja de adaptación ofrece claros beneficios, pero trae consigo la posibilidad de desarrollar efectos no deseados y con influencia a largo plazo, configurándose la difundida teoría de la programación fetal o el origen prenatal de las enfermedades (Young y col., 2002).
- c) La exposición a infección e inflamación prenatal son factores reconocidamente relacionados a daño cerebral con asociaciones que se remontan a 1955, momento en el que se reportó que la fiebre materna intraparto se asociaba a un incremento en 7 veces en desarrollar parálisis cerebral. Posteriormente se ha desarrollado la teoría del síndrome de respuesta inflamatoria fetal (Euser y col., 2005).

Muchos estudios hoy en día afirman que el ambiente gestacional es crucial para el desarrollo fetal, y el estrés prenatal es uno de los estímulos capaces de dejar una huella en el proceso de formación de la descendencia. La presencia de esta situación adversa durante la evolución fetal puede actuar sobre órganos específicos modificando su función y organización, y generando vías alternativas. Por ejemplo, es lo que ocurre en el cerebro mediante la neuroplasticidad (Mayer y col., 2006).

Hoy sabemos que la depresión, la ansiedad y el estrés psicológico guardan una relación estrecha con trastornos del cortisol materno y con la regulación anómala del eje H-H-A en la descendencia. De hecho, las evidencias sugieren que la relación entre el estrés prenatal y un desarrollo neural alterado puede ser parámetro de incidencia en trastornos

psiquiátricos. Diversas investigaciones que han estudiado los efectos del estrés prenatal sobre el eje HHA de las crías, en su estadio adulto y en respuesta a un estresor agudo, muestran que en general la respuesta de los GC esta aumentada (Bosch y col., 2007).

Además, parece que no sólo el tipo de estrés, sino también la magnitud y el momento del efecto estresante pueden afectar en gran medida las consecuencias.

Durante la gestación, el estrés aplicado a las madres induce cambios físicos, biológicos y psicológicos que podrían influir sobre el desarrollo de las crías, provocando trastornos adaptativos en la vida posnatal. Se ha determinado que los efectos de la exposición al estrés prenatal de las crías son variables, dependiendo de diferentes factores, entre los que se encuentran el sexo, la edad, la especie, el modelo de estrés prenatal utilizado y la etapa de la gestación en la que se aplica (García y col., 2010).

Algunos estudios investigaron si los niveles artificialmente elevados de GC en la madre pueden imitar los efectos de estrés prenatal sobre el sistema inmunológico de la cría. Estudios han reportado que el tratamiento prenatal con GC suprime transitoriamente varias funciones de los monocitos fetales, disminuyendo la proliferación de linfocitos, induciendo la involución del timo. Además, produce un aumento en sangre de la relación linfocitos T colaboradores (CD4 +) /células T citotóxicas (CD8 +); y una disminución en el número de células T en el bazo (Simmons, 2007).

Sin embargo, ni la hipersensibilidad mediada por células, ni las respuestas humorales se vieron afectadas en estos estudios. Una exposición corta a dexametasona al final de la preñez (último cuarto del período de gestación) tiene efectos comparables a los de un estrés gestacional tardío (último tercio del periodo gestacional) en la respuesta de la proliferación de linfocitos (Taylor, 1995).

El estrés prenatal tiene efectos inhibitorios no solo en el eje H-H-A, cuestión de no menor relevancia en cuanto a consecuencias adversas; sino que además provoca cambios en los parámetros del eje HHG, efecto que estaría mediado por altos niveles de corticosterona (Chen Cárdenas y col, 2013). El mecanismo de estas modificaciones en el eje H-H-G, se vislumbra en el hecho que, en las crías estresadas prenatalmente, se produce un aumento del índice apoptótico, fundamentalmente de las células germinales de los testículos y en las adrenales (Liaudat y col, 2014).

Los periodos prenatales y postnatal son etapas susceptibles a manipulaciones ambientales como la exposición a diferentes clases de estímulos estresantes. En animales, por ejemplo, la exposición a estresores tanto en la etapa prenatal como postnatal, induce a cambios a nivel del SNC que pueden persistir en la etapa adulta, demostrando la existencia de efectos a largo plazo. Entre estos cambios pueden

observarse modificaciones en la actividad del eje H-H-A; reduciendo la capacidad de habituación de las hormonas del eje H-H-A ante la exposición a mismo estrés en la edad adulta (Vallée y col., 1999; Ramirez I. y col., 2016).

El estrés materno, no sólo el gatillado por infecciones, sino además el causado por eventos situacionales como problemas interpersonales, desastres naturales y trastornos ansiosos, se ha asociado a un neurodesarrollo alterado con problemas tanto cognitivos como conductuales; estas situaciones estresantes generan altos niveles de cortisol materno. El aumento de cortisol en la madre, provoca que en la placenta se produzca una regulación positiva de la enzima 11B hidroxisteroide deshidrogenasa tipo II, encargada de convertir el cortisol en cortisona inactiva. Esta enzima se ubica en el sincitiotrofoblasto y previene que niveles altos de cortisol circulante en la madre no pasen a la circulación fetal. Se cree que estos niveles elevados de cortisol afectarían la adecuada expresión de genes en las células cerebrales fetales. A pesar de que la evidencia en humanos aún es débil, hay respaldo experimental en roedores y primates (Duenas, Z. 2012).

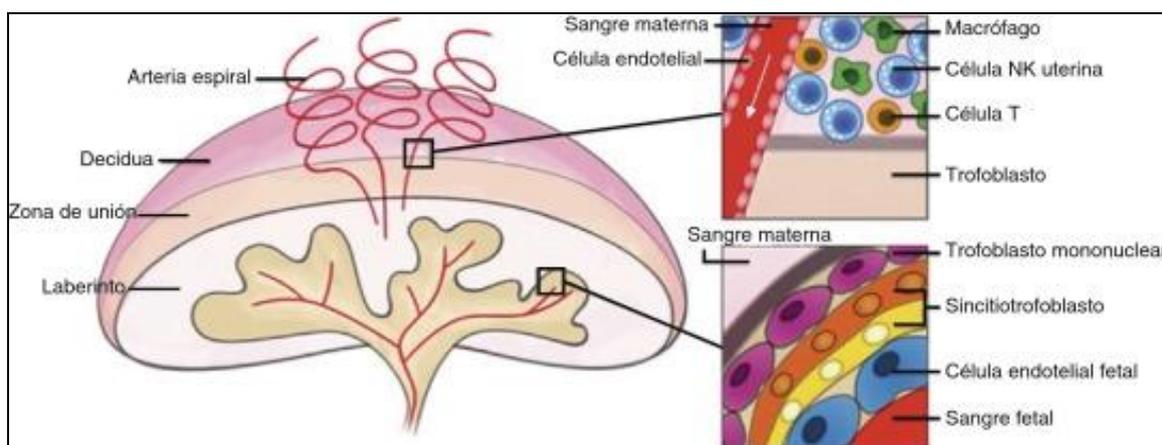
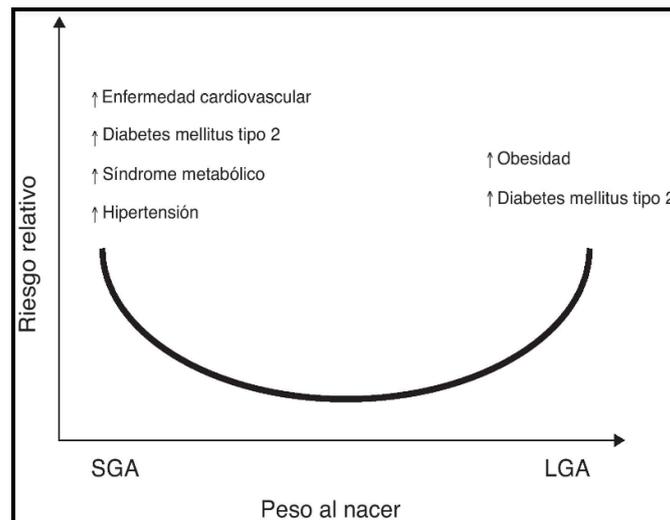


Fig. 12: Anatomía de la Placenta Materna e intercambio materno fetal (Díaz y Barba, 2016).

Cambios metabólicos in útero establecen patrones fisiológicos y estructurales a largo plazo que pueden programar la salud durante la vida adulta, teoría popularmente conocida como Hipótesis de Barker. Evidencia experimental y clínica sugiere que patologías como hipertensión arterial, enfermedad isquémica coronaria, síndrome metabólico y diabetes mellitus tipo 2, pueden programarse durante las primeras etapas del desarrollo fetal y manifestarse en etapas tardías, al interactuar con el estilo de vida y otros factores de riesgo adquiridos convencionales con el medio ambiente (Ramírez, 2011).

Se ha reportado, que existe una asociación entre el bajo peso y la talla al nacer, con el aumento en el riesgo de sufrir posteriormente enfermedades como hipertensión arterial (HTA), síndrome metabólico y accidente cerebrovascular. Cambios en el peso o en la composición corporal al nacer, ya sea en el rango superior de la normalidad para la edad gestacional (LGA por sus siglas en inglés, large for gestational age), o reducciones significativas en el tamaño y peso al nacer, (SGA por sus siglas en inglés, small for gestational age), podrían dar lugar a secuelas metabólicas en la etapa adulta (Simmons, 2007).



*Fig. 13: Riesgo relativo entre el peso al nacer con la prevalencia de enfermedades crónicas no transmisibles en la vida adulta (Whitaker, 2004).*

La natural complejidad de la gestación siempre ha despertado gran interés por ser uno de los procesos fisiológicos más espectaculares. Esta complejidad no se basa solo en el desarrollo de un nuevo individuo en el cuerpo materno, sino además en una indispensable y continua comunicación recíproca madre-feto. La constante interacción genera un enlace entre los dos organismos, teniendo lugar un mecanismo dinámico de influencia recíproca. Principalmente será la madre que comunicará activamente a su feto las vivencias tanto positivas como negativas que marcarán su desarrollo. Los cambios que tendrán lugar en la fisiología materna serán transmitidos al feto, caracterizando el proceso de programación fetal.

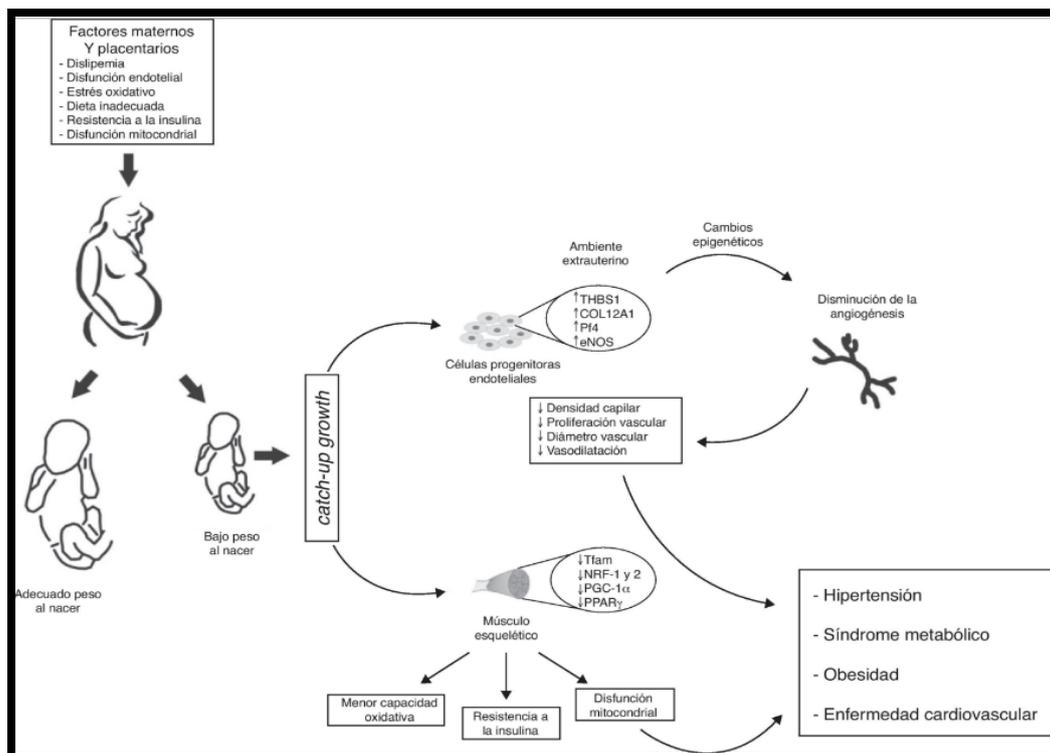


Fig. 14: Programación de la salud fetal intrauterina y sus consecuencias en la salud adulta (Ligi y col., 2011).

Esta programación fetal, propone que la enfermedad coronaria, el accidente cerebrovascular, la HTA y la diabetes mellitus tipo 2, se originan en la plasticidad del desarrollo que ocurre en respuesta a factores maternos y placentarios durante la vida fetal y la lactancia. Por ejemplo, se ha postulado que la HTA puede ser causada por el menor número de glomérulos que tienen las personas de talla pequeña como infantes con bajo peso al nacer (BPN) y con retardo en el crecimiento intrauterino (RCIU) (Ojeda y col., 2008).

El segundo proceso comprende la regulación hormonal y metabólica. Un recién nacido prematuro o con BPN, presenta mayor susceptibilidad de tener un patrón metabólico ahorrativo para el manejo de los nutrientes (Linares y Morales, 2012). La resistencia a la insulina y un incrementado estado de EO, que se asocia al BPN, podrían ser considerados desde esta perspectiva, como la persistencia de la respuesta fetal para la preservación de glucosa en el cerebro, a expensas del transporte de este carbohidrato al músculo, para su propio metabolismo y crecimiento. Este crecimiento fetal disminuido, ocasionaría una disminución en el número de células pancreáticas  $\beta$  y una disminución de la capacidad de producir insulina, conduciendo en la edad adulta a estados de resistencia a la insulina (Ross y Beall, 2008).

En una revisión sistemática publicada en 2008 por Whincup, reportó que, en la mayoría de las poblaciones estudiadas, el peso al nacimiento se hallaba inversamente relacionado con el riesgo de padecer diabetes mellitus tipo 2 e HTA (Whincup y col., 2008).

#### **I.1.4. ESTRÉS PRENATAL Y ESTRÉS OXIDATIVO**

##### ***I.1.4.1. Estrés Oxidativo***

El estrés se identifica como un mal de la vida moderna. Sin embargo, el estrés es algo inherente a la vida, es un mecanismo que permite a los seres vivos adaptarse. Diversas circunstancias estresantes conducen a la formación de un exceso de RL. Los RL 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 y han sido implicados como importantes mediadores patológicos en un gran número de trastornos clínicos (Azizbaigis y col., 2014). El término EO fue definido por Sies (1985) como la perturbación en el balance entre agentes oxidantes y antioxidantes en la célula, en favor de los primeros. Posteriormente el EO se ha definido como la alteración del control y la señalización redox. Los agentes oxidantes, principalmente especies reactivas del oxígeno (ROS) y del nitrógeno (RNS), se forman principalmente como resultado del metabolismo celular aeróbico. Sin embargo, hay que tener en cuenta que las ROS, RNS y demás especies reactivas son también importantes mediadores y reguladores de multitud de procesos fisiológicos, incluyendo la señalización celular, la regulación redox de la transcripción de genes, la inmunidad celular y la apoptosis, siendo esenciales para la función fisiológica normal de las células (Casado y col., 2014).

En 1946, Michaelis describió la reducción univalente secuencial del oxígeno como mecanismo molecular de cuatro pasos de transferencia de un electrón (Camps, 2010), con formación de radical superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), y radical hidroxilo ( $HO\cdot$ ) como los intermediarios de la reducción parcial del oxígeno y con formación de agua como producto final de la reducción:



Si bien el  $H_2O_2$  no es considerado un ROS, se lo puede categorizar como tal ya que es un intermediario indispensable para la conformación de RL, y además puede reaccionar fácilmente ante metales de transición, principalmente el  $Fe^{2+}$ , para producir el  $OH\cdot$  (Margaritelis y col., 2015).

Según la teoría del envejecimiento mitocondrial, tanto el  $O_2^-$ , el  $H_2O_2$  y el  $OH^\cdot$  reaccionan con relativa facilidad sobre macromoléculas claves para la correcta función celular, como lo son, los ácidos grasos de las estructuras fosfolipídicas, proteínas y los hidratos de carbono de los ácidos nucleico; dando lugar a un daño tisular continuo y progresivo que resulta en el envejecimiento. En los tejidos del individuo sano las mitocondrias son la fuente principal de producción de ROS y los únicos orgánulos celulares, aparte del núcleo, que contienen ADN. Los ROS pueden dañar a los lípidos, las proteínas y, de modo especialmente relevante para el envejecimiento, también al ADN. La información disponible apoya la teoría de que la tasa de generación mitocondrial de ROS puede ser uno de los factores principales determinantes de la velocidad del envejecimiento y, por lo tanto, de la esperanza de vida de cada especie animal (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Los ROS pueden atacar al ADN directamente a las bases o al esqueleto azúcar-fosfato, produciendo muchos tipos diferentes de modificaciones de las purinas y pirimidinas, como el marcador de daño oxidativo al ADN más comúnmente utilizado 8-oxo-7,8-dihidro-2'-deoxiguanosina (8-oxodG), así como rupturas de simple o doble cadena y mutaciones somáticas. Aunque se han descrito aumentos en el daño oxidativo al ADN con la edad en algunos estudios (Herrero y Barja, 2001) y otros no los han encontrado (Corrales y Ariza, 2012); el ataque oxidativo continuado al ADN a lo largo de toda la vida puede tener una consecuencia más importante a largo plazo debido a la capacidad de los ROS para producir mutaciones en el ADN.

Se considera al EO y la peroxidación lipídica, factores esenciales en el envejecimiento de las células aeróbicas, y además forman parte de una serie de determinantes etiológicos y patogénicos de enfermedades asociadas al envejecimiento. En consecuencia, se pueden detectar estos daños mediante la determinación de los productos de reacción entre RL oxidativos con otras biomoléculas. Dentro de estos productos reactivos se puede considerar el MDA, una de las sustancias consideradas como TBARS. Tanto el MDA como otros TBARS, son marcadores de la lipoperoxidación de los lípidos de membrana, la 8 OH-deoxiguasina, productos de la oxidación de ácidos nucleicos y los grupos carbonilos de proteínas oxidadas (Medina y col., 2017).

Las proteínas son un objetivo fundamental del daño oxidativo, debido a su abundancia en las células, en el plasma y en la mayoría de los tejidos, y también por su rápida tasa de reacción con RL y otros oxidantes, lo que provoca la pérdida de las funciones específicas de las proteínas dañadas. Se ha descrito la acumulación de las proteínas oxidadas con la edad. En los procesos de daño oxidativo a proteínas, algunos aminoácidos como la lisina, la prolina y la arginina, se oxidan dando lugar a grupos carbonilo, de modo que el

contenido en carbonilo de las proteínas se puede emplear como un indicador de daño oxidativo a las mismas (Arteel, 2003). Otros aminoácidos como la histidina, la cisteína y la metionina, también sufren daño oxidativo, pero no forman derivados de tipo carbonilo. Una de las características más importantes de la oxidación de proteínas, por una gran variedad de rutas, es la generación de grupos carbonilo. De hecho, entre todos los tipos de modificaciones debidos a dicha oxidación, las proteínas carboniladas son las más frecuentes. Por ello, se ha propuesto su cuantificación como un buen método para valorar el daño oxidativo proteico y su correlación con el envejecimiento y la severidad de algunas enfermedades. Este daño se puede determinar mediante dos métodos: el marcaje con borohidruro de sodio tritiado o mediante la reacción con fenilhidrazinas.

Existen diversos indicadores de estrés oxidativo en la fibra muscular, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), la interleucina (IL)-1, y prostaglandinas diversas; los cuales se ha demostrado en diversos modelos de experimentación animal, producen diversas disfunciones en enzimáticas dentro de la célula muscular, afectando la contracción de la misma. Estas moléculas proinflamatorias, inducen a su vez a la producción de diversos ROS y RNS.

Otro marcador de estrés oxidativo y daño celular es el MDA, siendo uno de los productos generados durante el proceso de la oxidación de los lípidos en las membranas biológicas, provocando una alteración estructural en las mismas, y con ello una pérdida de fluidez en el intercambio de nutrientes y gases. Este aumento en la rigidez de la membrana, es un índice ampliamente utilizado para conocer el nivel de oxidación. Se han descrito varios métodos de detección, pero la mayoría son poco específicos ya que detectan todos los aldehídos de la muestra al utilizar TBARS. Gracias al desarrollo de la cromatografía líquida de alta resolución, se consigue la separación del aductomalondialdehído-ácido tiobarbitúrico de otras sustancias que pueden interferir en la determinación. En el presente trabajo se ha medido el MDA ya que numerosos estudios revelan su incremento con el envejecimiento (Belenguer y col., 2015).

El EO es una de las causas o trastornos, conocidas o probables, asociada con el crecimiento fetal adverso (disminución o exceso) o parto pretérmino; éste puede ser el factor común de programación, en la asociación de dichas condiciones y riesgo elevado de padecer enfermedades en la etapa adulta. Los mecanismos de programación del estrés oxidativo pueden ser directos, a través de la modulación de la expresión génica, o indirectos, mediante el efecto de ciertas moléculas oxidadas. La programación adversa puede ocurrir sin afectar el crecimiento fetal, pero ésta es más frecuente en los niños de bajo peso, porque con mucha frecuencia experimentan alteraciones, conocidas o

desconocidas, con efectos oxidativos. A esta interacción entre los genes y los productos casuales del fenotipo, es decir la información codificada en los genes y que son el reflejo de señales intracelulares devenidas de la exposición a ciertos estresores externos, se lo conoce lo que Waddington (1942) llamo, epigenética (Feiberg, 2008). Esto puede ser la causa de diversas patologías metabólicas, cardiovasculares, y neurodegenerativas, de tanta relevancia en los indicadores de salud actuales (Freire y col., 2013). Los mecanismos de programación del EO pueden ser directos, a través de la modulación de la expresión génica, o indirectos, mediante el efecto de ciertas moléculas oxidadas. El EO se modifica fácilmente durante el embarazo y en los periodos posnatales tempranos (que son ventanas críticas admisibles) (Luo y col., 2006).

Las causas fundamentales de esta programación aumentada sobre el EO en las crías estresadas prenatalmente, se asocian estrechamente con la alteración materna durante el embarazo, vinculado directamente a los diferentes factores que influyen en el ambiente fetal. El ambiente fetal subóptimo, debido a la nutrición inadecuada, infección, anemia, hipertensión, inflamación, diabetes gestacional o hipoxia en la madre, expone al feto a factores metabólicos, hormonales, citocinas o adipocinas; los cuales afectan los parámetros metabólicos, del sistema inmunitario, vasculares, renales, hemodinámicos, del crecimiento y mitocondriales en etapas posteriores de la vida. Esto se relaciona directamente con diversas deficiencias en lo pertinente al manejo de la homeostasis de la glucosa, resistencia a la insulina, diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, enfermedad cardiovascular, obesidad y enfermedad cardiaca en la etapa adulta. Demás está decir que esta programación *in útero*, luego puede verse directamente influenciada y potenciada por eventos epigenómicos ambientales; como por ejemplo la sobrealimentación, el insomnio, el hiposomnio o la hipocinesia.

El efecto de los corticoesteroides en las madres para acelerar la maduración pulmonar fetal en los partos pretérmino, no se circunscribe sólo al pulmón, pues el mensaje esteroideo produce que otros órganos, como el riñón y el corazón, también aceleren su maduración y disminuyan el número de células, lo que resulta en riesgo elevado de padecer hipertensión y enfermedades cardíacas (Lee y col., 2005).

La exposición a citocinas maternas por procesos infecciosos se asocia con riesgo elevado de sufrir parálisis cerebral; por lo tanto, dichas moléculas no sólo suprimen el proceso inflamatorio en la madre sino el crecimiento y maduración del sistema nervioso central en el feto. La oxidación de los componentes de las lipoproteínas de baja densidad (LDL) es una de las piedras angulares de la arteriosclerosis (Ross, 1993). Las LDL oxidadas

(LDLox) participan en varios procesos que favorecen la aparición y progresión de la placa ateromatosa.

La oxidación de las LDL es un proceso complejo, que depende básicamente de tres factores:

- a) La formación RL: los RL son moléculas inestables y muy reactivas que se producen en las reacciones en las que interviene el oxígeno. Pueden reaccionar con todas las moléculas del organismo (proteínas, lípidos, DNA) alterando su estructura y su función. La reacción de los RL con los ácidos grasos es la responsable de la oxidación de las LDL (denominada peroxidación lipídica)
- b) Las sustancias antioxidantes: para protegerse de la acción de los RL, el organismo dispone de un sistema de defensa antioxidante. Este sistema está formado por sustancias de origen endógeno, sintetizadas por el propio organismo, como las enzimas superóxido dismutasa (SOD), la glutatión reductasa (GPX) o la paraoxonasa (POX); y de origen exógeno, ingeridas con los alimentos, como las vitaminas E y C, los  $\beta$ -carotenos y los polifenoles. Además, los antioxidantes son un grupo heterogéneo de sustancias que actúan de forma sinérgica, unos en el medio acuoso (GPX, SOD, Vit. C, polifenoles) y otros en el lipídico (POX, Vit E,  $\beta$ -carotenos).
- c) Las propiedades intrínsecas de las LDL: a mayor tamaño y menor densidad de la partícula menor es la susceptibilidad de la partícula de LDL a la oxidación; el mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados, así como la glucosilación de la partícula determinan una mayor susceptibilidad a la oxidación; por otra parte, la mayor presencia de sustancias antioxidantes principalmente la vitamina E y en menor medida, los  $\beta$ -carotenos en la propia partícula de LDL protegen de la acción de los radicales libres.

Por último, podemos decir que el estrés oxidativo genera una mayor biosíntesis de marcadores de daño inflamatorio, incluyendo el TNF- $\alpha$ , IL-6, prostaglandinas y óxido nítrico. Esto se vería justificado con una mayor acción de las enzimas que generan estos marcadores, como la ciclooxigenasa y el óxido nítrico sintetasa; que por otra parte se incrementan ante una exposición a un agente estresante de carácter agudo, como puede ser el ejercicio físico extenuante. Ante la misma situación, existe una activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF-B), sensible a los cambios redox intracelulares, contribuyendo al daño inflamatorio, mediando un incremento coordinado en la expresión de genes proinflamatorios.

Un importante campo de estudio son los biomarcadores de EO, quienes nos indican cuan significativo es el mismo e indicar si hay daño celular por presencia de RL. Davies y Packer midieron un biomarcador de peroxidación lipídica lo que es probablemente el periódico más influyente en el campo radical y ejercicio (Davies K. y Packer L.1982) La utilidad de los biomarcadores abarca tanto la comprobación tanto del daño oxidativo como la utilidad o inutilidad de suplementos antioxidantes (Paulsen G. y col., 2014).

En la investigación biomédica, un biomarcador se define como un personaje que se puede medir y evaluar objetivamente como un indicador de procesos biológicos o patógenos normales, o farmacológicos respuestas a una intervención terapéutica. El potencial de diagnóstico de un biomarcador depende, por lo tanto, de la distinción precisa de las alteraciones que corresponden al inicio, progresión, regresión, e idealmente, a la predicción de un proceso biológico específico en el momento de la recolección de la muestra (Merlo D. y col., 2006; Vineis P y Pererira F., 2007)

En los primeros experimentos, los biomarcadores de estrés oxidativo fueron útiles para establecer la presencia o ausencia de estrés oxidativo en diversos procesos fisiológicos y enfermedades (Halliwell B. 1999). Esta es una tarea que varios biomarcadores de estrés oxidativo disponibles sin duda pueden cumplir.

Esto apoya la idea que el campo de investigación sobre la biología redox está intrínsecamente entrelazado con biomarcadores del estrés oxidativo y los mismo sirven para describir situaciones no patológicas donde el equilibrio redox se ve alterado, como es el caso del ejercicio físico.

El ejercicio es probablemente uno de los ejemplos más característicos demostrando que las especies reactivas y el EO no son necesariamente entidades "dañinas".

#### **I.1.4. Ejercicio físico y EO**

Por cada 25 moléculas oxidadas por la respiración mitocondrial normal en organismos aeróbicos, ocurre una reducción incompleta en una molécula (Nikolaidis y col., 2015). Esta sola oxidación-reducción incompleta, en reposo, genera ROS, como superóxido, peróxido de hidrógeno o hidroxilo radical, que son moléculas altamente reactivas que pueden atacar y dañar la estructura celular. En este sentido el ejercicio físico supone un condicionante altamente oxidativo ya que aumenta la tasa metabólica de producción energética y por tanto de reducción de macromoléculas.

El ejercicio representa un estrés físico que interrumpe transitoriamente homeostasis (Mastorakos G. y Pavlatou M., 2005), y el músculo esquelético en funcionamiento es claramente el órgano más directamente afectado durante la actividad física. Estudios

Indican que el ejercicio puede inducir daño estructural a las células musculares (Hoene M. y col., 2010), y la producción de subproductos metabólicos, como el lactato (Malaguti M. y col., 2009), y ROS (Alesio H., y col., 2000; Gomez-Cabrera M. y col., 2009; Fogarti M. y col., 2011)

Tanto la práctica de ejercicio físico agudo, como la sistematización del mismo en forma de entrenamiento, influyen en la producción de RL. El ejercicio físico modifica el funcionamiento de los sistemas antioxidantes y la susceptibilidad de las LDL en cuanto a su respectiva oxidación. Durante la práctica de un ejercicio físico, se produce un aumento del consumo de oxígeno que se traduce en una mayor formación de RL. Mientras se realiza un arduo trabajo ejercicio, la tasa metabólica en el músculo esquelético aumenta a 100 veces por encima de los niveles de reposo, con marcados aumentos en consumo de oxígeno y producción elevada de anión superóxido en las mitocondrias (Brooks y col., 2008). El hecho de que la producción de ROS no es estrictamente proporcional al consumo de oxígeno durante el ejercicio, tal como fue descrito en condiciones de reposo, evidencia la participación de otras fuentes de generación de ROS, como los fenómenos de isquemia reperfusion, las reacciones enzimáticas e inmunitarias, la autoxidación de catecolaminas, la producción de ácido láctico, la producción de óxido nítrico, entre otros (Finaud y col., 2006).

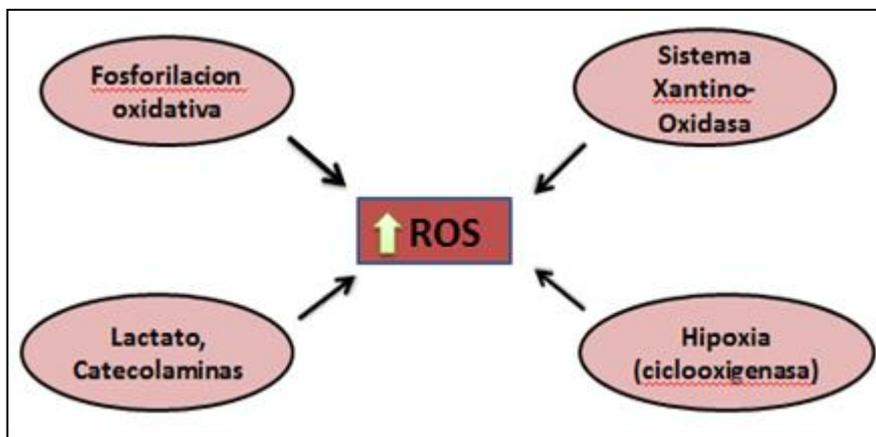


Fig. 15: Fuentes de producción de ROS durante el ejercicio, según la intensidad, duración y tipo de ejercicio (adaptado de Fernández y col., 2009).

Por otra parte, estudios en ratas wistar han demostrado que el ejercicio agotador aumenta el consumo de oxígeno en todo el cuerpo y en tejido musculares esqueléticos hasta 20 veces, lo que eleva la fuga de electrones del sistema de transporte mitocondrial, alterando el balance entre pro-oxidantes intracelular y antioxidantes, en la homeostasis. Esta condición desfavorable es una seria amenaza para la defensa antioxidante celular sistema con reservas disminuidas de antioxidante vitaminas y glutatión (Aydin y col. 2007). Este

aumento puede ser tan significativo, que está por muy por encima del accionar de los sistemas antioxidantes. De esta forma, se produce un aumento en los procesos de oxidación, entre ellos, por supuesto, la oxidación lipídica.

El ejercicio es también un gran desafío para otros órganos como el músculo cardíaco, el estómago o el cerebro, según el protocolo de ejercicio físico usado (Cakir B. y col., 2010; Veneroso C. y col., 2009). Esto es particularmente relevante para el hígado debido a su papel central en el mantenimiento del suministro de glucosa y cuerpos cetónicos al músculo en ejercicio y otros tejidos demandantes (Hoene M. y Weigert C. 2010). Existen estudios que apuntan a evaluar el estrés oxidativo en el hígado por ejercicio agudo, han demostrado un aumento de la peroxidación lipídica (Gul M. y col., 2002; Huang C. y col., 2008;), y carbonilación de proteínas (Korivi M. y col., 2012), y por otra parte una disminución de las defensas antioxidantes (Anastasios y col., 2014).

Diversos estudios realizados en ratas wistar han evidenciado que el ejercicio físico agudo hasta el agotamiento, utilizando carrera en tapiz rodante, aumentó notablemente los niveles de MDA, especialmente en músculo esquelético, hígado y cerebro (Schneider y col., 2005; Thirumalai y col., 2011; Lima y col., 2013; Piedrafita- Trigo, 2013). Se ha sugerido que la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (RONS) y posterior oxidación de macromoléculas (principalmente de lípidos LDL), que conducen a un estado de estrés oxidativo; se produce en respuesta al ejercicio aeróbico hasta el agotamiento, debido a una perturbación en el transporte de electrones con el correspondiente aumento de consumo de oxígeno. Sin embargo, en relación con el ejercicio anaeróbico existen otras vías de generación RONS incluyendo condiciones de reperfusión isquémica, producción de xantinas y NADPH oxidasa, metabolismo prostanoide, actividad de ruptura respiratoria fagocítica, disrupción de proteínas que contienen hierro y alteración de la homeostasis del calcio (Bloomer y Goldfarb, 2004). La disfunción mitocondrial parece ser un problema clave durante el ejercicio exhaustivo, y puede causar daño oxidativo y daño tisular al hígado, entre otros órganos (Powers S. y col., 2010).

Otras investigaciones demostraron que después del ejercicio agudo, la concentración de MDA no se vio afectada en el músculo sóleo, extensor del miembro superior, de contracción lenta en ratas estradas por series de velocidad en tapiz rodante, sino que se elevó en el músculo extensor largo de los miembros delanteros, indicando un aumento en la peroxidación lipídica en las fibras del tipo rápidas. Por otro lado, la concentración de MDA en musculo esquelético en ratones entrenados en series de velocidad, se redujo

significativamente, lo que sugiere una disminución de la peroxidación lipídica (Cunningham y col., 2005).

En varios estudios se ha observado que tras realizar un ejercicio físico se produce un aumento de los niveles plasmáticos de productos derivados de la oxidación lipídica. En algunos, se observa que este aumento se relaciona directamente con la intensidad del ejercicio. Sin embargo, este aumento del estrés oxidativo no es persistente y al menos en personas entrenadas se normaliza en pocas horas (Treuth y col., 1996).

Otro dato fundamental, que se desprende de estos estudios, es que en animales o personas entrenadas o adaptadas a determinados estresores motrices, el aumento en la formación de ROS es menor que en los sujetos que realizaron el ejercicio por única vez y de manera aguda, sugiriendo la existencia de un efecto protector de la ejecución sistemática del ejercicio físico, es decir del proceso de sistematización/dosificación del estresor (entrenamiento); a pesar de registrarse valores absolutos mayores de ROS y RNS (Rossman y col., 2013).

De hecho, el entrenamiento físico ha se ha informado que produce respuestas adaptativas al EO, como estudió principalmente en los músculos esqueléticos (Hecksteden y col., 2015) pero también en el hígado. Otros estudios identificaron que 8 semanas de entrenamiento aeróbico en la cinta de correr aumentaron relación reducida / oxidada de glutatión (GSH / GSSG) (Radak Z. y col., 2000), y 10 semanas de entrenamiento corriendo aumentaron los niveles de superóxido dismutasa (SOD) y catalasa (CAT), actividades enzimáticas hepáticas en ratas (Botezelli J. y col., 2011; Wilson D. y Johnson P., 2000).

De hecho, el ejercicio regular conduce a muchas adaptaciones beneficiosas relacionadas con el equilibrio redox, sustentados por episodios repetidos en la producción de ROS (Brooks S. y col., 2008). La capacidad antioxidante aumenta a costa de un aumento de numerosas enzimas antioxidantes; como la SOD, CAT (Cobley J. y col., 2014), glutatión reductasa (GR) y GSH (Ji L. 2008), aumento de antioxidantes no enzimáticos como el glutatión (Gomez-Cabrera M. y col., 2008), aumento en el contenido de proteínas chaperonas o proteínas de choque térmico (Nikolaidis A. y col., 2011), quienes juegan un papel crucial para el óptimo acoplamiento, ensamblaje y transporte de proteínas recién sintetizadas.

Este fenómeno fue observado en el tejido hepático de ratas wistar luego de un entrenamiento de 12 semanas (Kakarla P. y col., 2005). Estas evidencias experimentales apuntan a mecanismos de regulación antioxidante en el hígado impulsados por el entrenamiento en roedores. Un mecanismo para explicar este aumento de la oxidación

lipídica puede deberse a una reducción de la reesterificación de los ácidos grasos en la célula adiposa, luego de producirse la lipólisis. Otro factor es la capacidad de transporte de ácidos grasos del tejido graso periférico a los músculos y la capacidad de captación muscular. Se ha demostrado que existe una correlación entre el aumento de la concentración plasmática de ácidos grasos libres (AGL) y la captación de estos AGL por el músculo durante la práctica de ejercicio. Este aumento en la capacidad de captación muscular de AGL está directamente relacionado con un aumento en la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) muscular, quien acelera el proceso de paso del ácido graso adentro de la fibra muscular para su posterior consumo (Cobley J. y col., 2015).

La diferencia en la captación muscular de AGL entre un sujeto entrenado y uno no entrenado, radica que en la fibra muscular entrenada el aumento responde de manera lineal con la disponibilidad de AGL circulantes, mientras que en el músculo no entrenado la captación de AGL alcanza un techo máximo con el tiempo. Esta diferencia entre el músculo entrenado y no entrenado explica parcialmente la mayor utilización de grasas en el músculo entrenado durante la práctica de ejercicio y sugiere que las adaptaciones locales al entrenamiento, como por ejemplo el aumento de la actividad de la LPL, son importantes. Por otra parte, la captación muscular de glucosa aumenta durante la práctica prolongada de ejercicio tanto en personas entrenadas como en no entrenadas, aunque esta captación es mucho mayor en personas no entrenadas, ya que se dispone de una menor oxidación de ácidos grasos debido a un menor funcionamiento de la LPL y la consecuente  $\beta$  oxidación intra miofibrilar (Nikolaidis M. y col., 2013).

Varios estudios experimentales han analizado el efecto del ejercicio físico del tipo agudo sobre la susceptibilidad de las LDL para entrar en el proceso de oxidación mitocondrial. En individuos entrenados inmediatamente después de finalizar una carrera de 4 h de duración, se producía un aumento de la susceptibilidad a la oxidación de las LDL. Mientras que a las 8 horas de transcurrido el esfuerzo, esta peroxidación se veía totalmente disminuida y por lo tanto normalizada. Esto podría ser debido a que la práctica regular de ejercicio produce un aumento de la actividad de las enzimas antioxidantes endógenas, reduciendo el estrés oxidativo. Vale mencionar que el tipo de estresor físico, produce ciertas intensidades en cuanto a la producción de RL; ya que las bajas intensidades causan una menor producción de los mismos, mientras que el ejercicio vigoroso e intenso aumenta el EO y puede dañar el sistema de defensa antioxidante (Tozzi- Ciancarelli y col., 2002).

Una de las consecuencias más importantes de esta disminución de la oxidación lipídica es la reducción simultánea de los marcadores sistémicos de inflamación. En varios estudios

transversales se ha descrito la asociación inversa entre la práctica regular de actividad física y diversos marcadores de inflamación, especialmente la proteína C reactiva de alta sensibilidad (CRPhs) (Zulet y col., 2007).

## **II. HIPOTESIS**

El estrés prenatal produce una mayor reactividad del eje Hipotálamo Hipófiso-Adrenal y del Sistema Nervioso Simpático en ratas adultas sometidas a un estrés agudo por nado forzado, lo cual provoca estrés oxidativo en hígado y en el músculo de las crías.

## **III. OBJETIVO GENERAL**

Investigar el efecto del estrés físico agudo por nado forzado, en ratas machos adultas estresadas prenatalmente por IMO crónico sobre la actividad del eje HHA y del SNS, y su relación con el estrés oxidativo y la respuesta fisiológica del músculo e hígado.

### ***III.1 Objetivos específicos***

Investigar el efecto del estrés físico por nado forzado, agudo, en ratas machos adultas estresadas prenatalmente por IMO crónico sobre:

- a) Los niveles de Corticosterona (COR).
- b) El tamaño de las glándulas adrenales.
- c) Los niveles de Glucemia (GLU).
- d) La concentración de Malondialdehido (MDA) del Hígado y musculo esquelético.

## **IV. MATERIAL Y METODOS**

### ***IV.1 Obtención de los animales de experimentación***

Se utilizaron ratas macho, albinas, Wistar, de 90 días de edad, mantenidas en condiciones estándar de bioterio (luz 7.30 a 19.30 hs y temperatura  $20 \pm 2$  °C), a quienes se le suministró agua y alimento "ad libitum". Estos animales fueron hijos de madres gestantes sometidas a estrés por IMO (Michajlovskij y col., 1988) crónico, intermitente e incontrolable durante 30 minutos, tres veces por semana, durante las dos últimas semanas de preñez. Estas crías fueron denominadas estresadas prenatalmente (EP). Por otro lado, las crías cuyas madres no fueron estresadas prenatalmente, fueron denominadas controles prenatales (CP). Además, parte de estos dos grupos (EP y CP) fueron sometidos a estrés por nado (N) y surgieron dos grupos más: EP-N y CP-N.

En cuanto a la preñez, las hembras fueron apareadas en jaulas grandes, en una proporción de tres hembras por macho, de 4 meses de edad y sexualmente maduras, con el fin de obtener el mayor número de hembras preñadas. El momento preciso en que se produjo el servicio de la hembra, se determinó todos los días por la mañana, entre las 9:00 a.m y las 11:00 a.m horas, (ciclado). Para ello, a cada una de ellas se les extrajo exudado vaginal y posteriormente fue analizado en el microscopio, para determinar la presencia de espermatozoides. Las hembras que poseían espermatozoides en el exudado vaginal fueron separadas en jaulas individuales (se consideró como el día uno de preñez).

Luego del nacimiento se dejaron 8 crías (machos y hembras) por madre, tanto de un grupo control sin estrés prenatal (CP), como las del grupo experimental con estrés prenatal (EP) estresadas prenatalmente. Un solo operador realizó el manejo de los animales. A los 21 días de edad se destetaron todas las crías, y se sexaron a los 40 días de edad, para dejar sólo a los machos. A los 90 días de edad, previo al sacrificio se les aplicó una sesión de Nado Forzado a los grupos correspondientes (como se explica más adelante). Al momento de realizar el experimento se utilizaron solo 2 machos por camada para evitar el "efecto camada" (Chapman y Stern, 1978).

### ***IV.2 Estrés prenatal***

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

Todas las sesiones de estrés se realizaron de forma intermitente e impredecible durante 30' min. diarios, durante tres veces por semana, las dos últimas semanas de preñez.

Todo esto, dentro de una habitación alejada del resto de los animales, evitando la situación de estrés para los mismos.

### IV.3 Estrés postnatal

El estrés agudo postnatal por nado, consiste en una sola sesión de nado por las ratas durante 20 minutos, sin experiencia previa, en una pileta de 50 cm de largo, 30 cm de ancho y 60 cm de profundidad; y la temperatura del agua a  $35 \pm 2$  °C.

Esta prueba se basa en el método original de Porsolt y col. (1978). Se utilizó agua limpia para cada ensayo, porque si previamente nadó otra rata que no es de la camada, se demostró, que se altera el comportamiento de la misma (Abel, 1993)

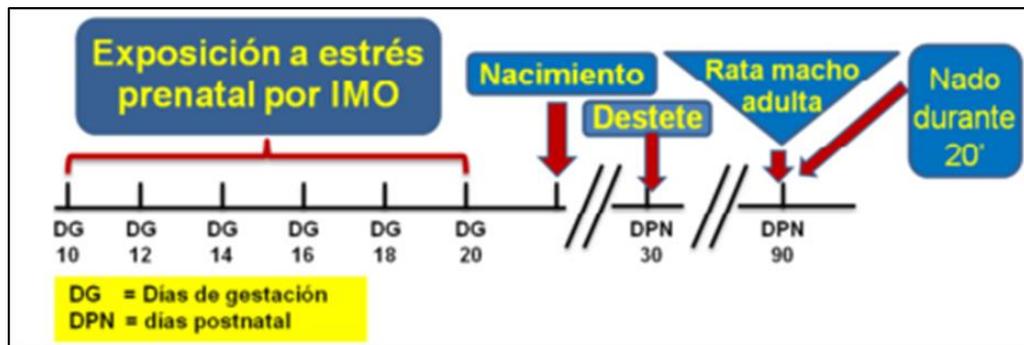


Fig. 16: Esquema del protocolo de aplicación del estrés por IMO gestantes y el estrés por nado forzado en crías machos adultos (Huck, 2014).

### IV.4 Diseño experimental

De estos dos tratamientos, estrés prenatal y estrés postnatal, surgieron los siguientes grupos: Grupos: CP-C, CP-N, EP-C y EP-N

- CP-C: ratas hijas de madres no estresadas, sin estrés postnatal por nado.
- CP-N: ratas hijas de madres no estresadas, sometidas a una sesión de estrés postnatal por nado forzado durante 20 minutos (de 10 a 10.20 a.m).
- EP-C: ratas hijas de madres estresadas, sin estrés postnatal.
- EP-N: ratas hijas de madres estresadas, sometidas a una sesión de estrés por nado forzado durante 20 minutos (de 10 a 10.20 a.m).

#### IV.4.1. Esquema diseño experimental

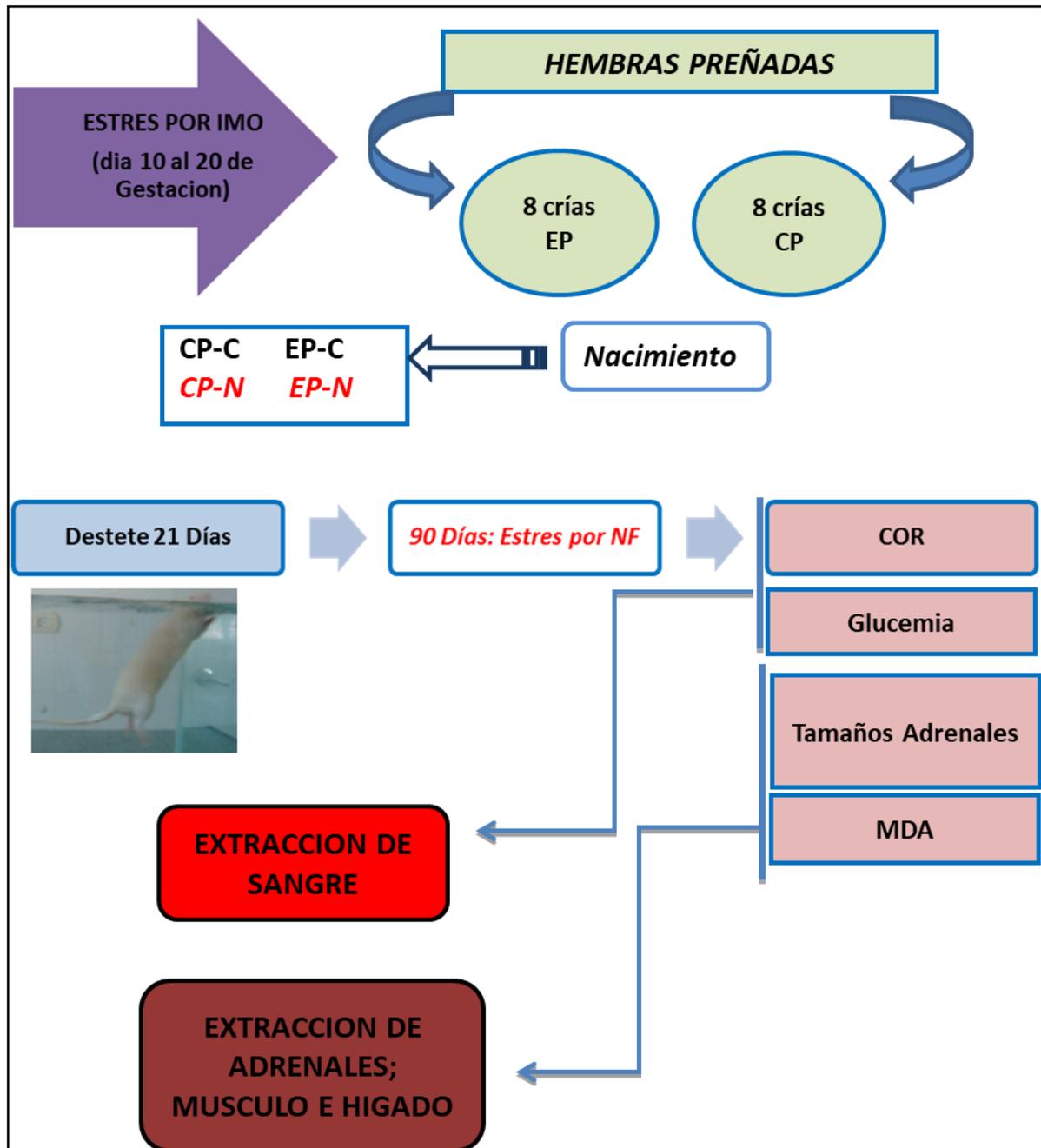


Fig. 17: Modelo estrés, respuestas neuroendocrinas y determinaciones de las variables pertinentes al protocolo de investigación.

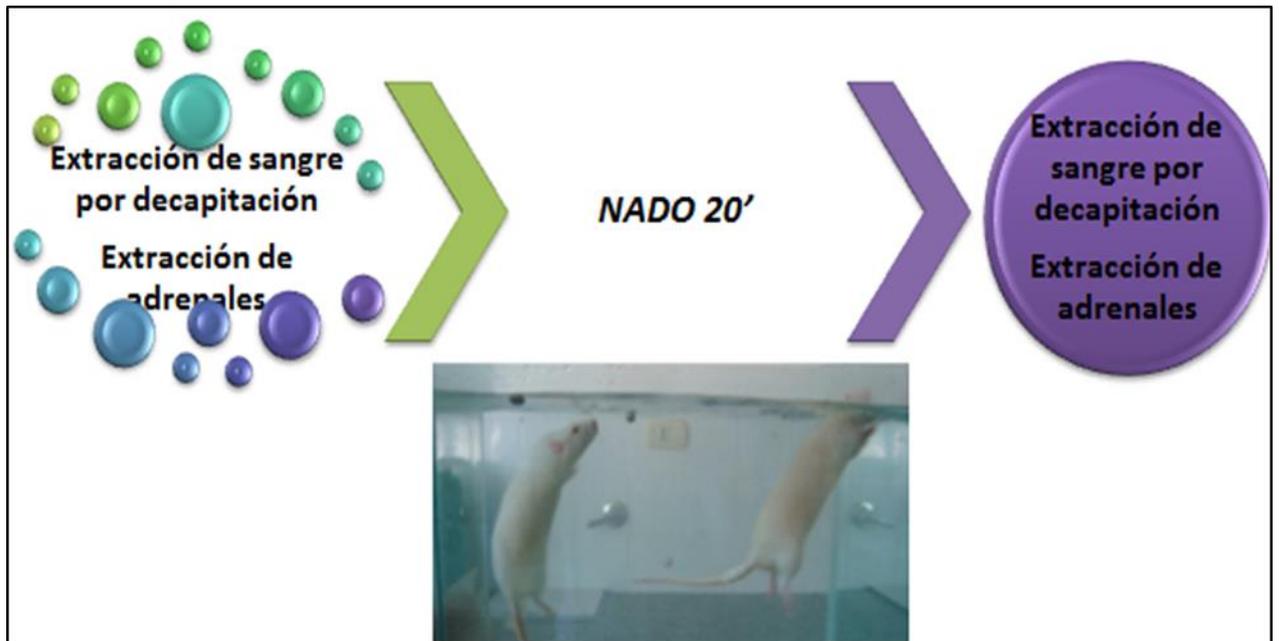


Fig. 18: Esquema de extracción de muestras pre y post modelo de estrés utilizado (nado forzado).

Finalizado los tratamientos pre y post natales, se sacrificaron los animales por decapitación y se recolectaron muestras de sangre en tubos heparinizado. Los tubos (cuya sangre se obtuvo en el término de dos minutos) se centrifugaron inmediatamente a 3000 rpm durante 15 min y se separó el plasma, el cual se conservó a -20 °C, hasta la realización de las determinaciones de COR por RIA y de glucosa mediante el uso de un método colorimétrico.

Este procedimiento se realizó en una sala contigua, teniendo la precaución de no exponer a los otros animales al olor de la sangre, para evitar un estrés adicional. Con el plasma de dicha sangre, se determinó:

1. la concentración de COR plasmática por radioinmunoensayo (RIA) (Krey y col., 1975). La sensibilidad de este ensayo fue de 10 pg of COR, y los coeficientes de variabilidad inter e intra-ensayo fueron < 10%.
2. Por otro lado, se determinó la glucemia en todas las muestras, mediante un equipo comercial enzimático de Wiener. La obtención de las muestras se realizó en todos los casos antes de los 2 minutos de extraído el animal de su jaula o de la piscina de nado a fin de no modificar, por la manipulación, los niveles de las variables estudiadas.
3. Además, a todos los animales se les extrajeron las adrenales para obtener con ellas el índice adrenosomático, que relaciona el peso de ambas adrenales con el peso corporal del animal, según la siguiente ecuación: Índice adrenosomático=

[Peso de las adrenales (g)/ Peso corporal (g)] x 1000. Finalmente, ambas adrenales fueron fijadas en formol bufferado al 10 % a fin de determinar posteriormente en ellas la relación corteza-médula, mediante la técnica histológica convencional, con la tinción de hematoxilina-eosina. Las mediciones se efectuaron mediante microscopio ZEISS ® asociado a un VIDAS-CONTRON ®.

4. Para demostrar el efecto del estrés postnatal en las concentraciones de MDA en hígado y musculo esquelético, luego del deceso de los animales de experimentación por decapitación, se les extrajo el hígado y el musculo esquelético tríceps del miembro superior derecho. La medición del MDA en tales tejidos se lo tomó como marcador de la peroxidación lipídica y el consecuente estrés oxidativo celular. Se determinaron las concentraciones de MDA en homogenato de hígado y musculo esquelético, mediante 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.

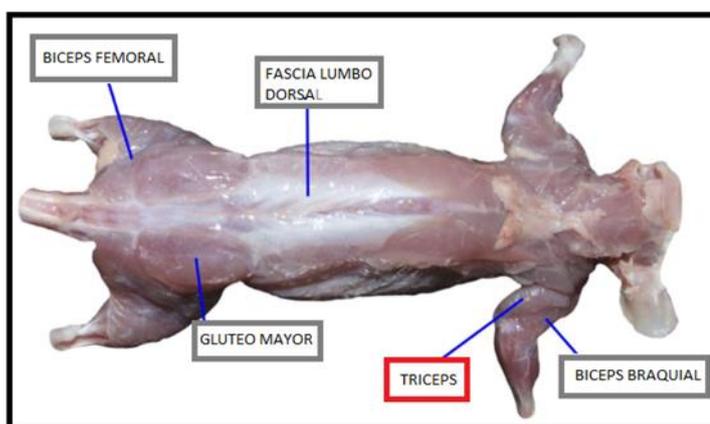


Fig. 19: Imagen anatómica dorsal de ratona Wistar macho. En rojo el tríceps sural usado para las determinaciones de MDA.

#### **IV.5. Determinación de la COR por RIA**

##### **IV.5.1. 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<sub>2</sub> y 0.1 % gelatina. Se conserva 1-2 semanas a 4°C.
- Corticosterona tritiada (COR- 3 H) 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 mg/ml (primera hija). Ambas se mantuvieron a 4°C y son estables por 1 año y 1-2 meses respectivamente.
- Carbón activo.

#### IV.5.2 Procedimiento

Curva patrón: El día del análisis se preparó una solución de trabajo tomando 16 µl de la solución hija y diluyéndola en 984 µl de tampón de RIA (se obtiene una solución standard (St 1) de una concentración de 1600 pg/10 µl). A partir de ésta, se prepararon diluciones a la mitad hasta una solución (St 7) de concentración de 25 pg/µl. En los tubos correspondientes a la curva patrón en el análisis, se colocaron 10 µl de tampón (B o = ceros, NSB= inespecíficos) o 10 µl 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 µl en cada tubo de RIA (excepto a los NSB que en lugar de antisuero llevaron 100 µl de tampón).

Hormona marcada COR- 3 H: Se preparó una solución de trabajo diluyendo la hormona marcada en el buffer fosfato para RIA. Esta dilución contenía siempre unas 8000 cpm/100 µl de tampón.

Muestras: Plasma sin diluir para muestras control, para muestras de animales estresados se diluyó según el tiempo de estrés transcurrido.

- Líquido de centelleo: Mezcla centelladora Optiphase "Hisafe" 3 (Perkin Elmer)

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

- µl de patrón o tampón o muestra.
- 200 µl de tampón y luego se agitó en un vortex.
- Se colocaron los tubos durante 30 min a 70°C, para desproteinizar, en un baño y luego se enfriaron en hielo.
- Se colocó 100 µl de la hormona marcada.
- Se agregó 100 µl del antisuero (excepto a los NSB).

- Se agitaron los tubos en un vortex y se incubó a 4°C durante 18-24 h.

TUBOS	TAMPON	MUESTRA	Agitar y luego a 70° C 30 min. enfriar	COR-H <sup>3</sup>	ANTISUERO	Agitar y luego a 4° C 18-24 hs.
NSB	210 µl	-----		100 µl	-----	
NSB	210 µl	-----		"	-----	
B <sub>0</sub>	210 µl	-----		"	100 µl	
B <sub>0</sub>	210 µl	-----		"	"	
St 1	210 µl	10 µl		"	"	
Muestras	"	"	"	"		

Fig. 20: Cuadro de concentración de soluciones.

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 centrífuga, 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 3 H actividad 10 5 dpm). Se confeccionó una curva en papel log-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:

$$\% \text{ de unión} = \frac{\text{cpm de la muestra o estándar} - \text{cpm de tubo NSB}}{\text{cpm del B 0} - \text{cpm del tubo NSB}}$$

Donde cpm: cuentas por min. Para cada una de las muestras se calculó el porcentaje de unión y se extrapolo en la curva de manera de obtener la correspondiente concentración de COR.

#### IV.6. Determinación de la glucemia

Se realizó mediante el uso de un equipo enzimático comercial (Wiener). El fundamento del método colorimétrico utilizado en este equipo es que la glucosa de la muestra es oxidada a ácido glucónico por acción de la enzima glucosa oxidasa. El

peróxido de hidrógeno producido, en presencia de la peroxidasa 4-aminofenazona y el fenol, forma una quinoneimina con un pico de absorción a 505 nm. La intensidad del color es proporcional a la concentración de la glucosa de la muestra.

Cálculo de la glucemia:

$$\text{Glucosa (g/l)} = \frac{\text{Absorbancia de la muestra desconocida}}{\text{Absorbancia del estándar}}$$

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

#### **IV.6.1 Extracción de las glándulas adrenales**

##### **IV.6.1.1. Materiales**

- Balanza
- Guillotina
- Material de cirugía

##### **IV.6.2. Procedimiento**

1. Se pesó el animal.
2. Se lo decapitó.
3. Se lo colocó en decúbito dorsal.
4. Se realizaron sendas incisiones a lateral de la línea media.
5. Se retiraron ambas glándulas adrenales.
6. Se eliminó totalmente la grasa que las rodea.
7. Se las pesó.

Cálculo del índice adrenosomático (IAS)

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

#### **IV.7. Determinación de la concentración de MDA**

Como marcador de la peroxidación lipídica, se determinó la concentración de MDA en homogenato en hígado y musculo esquelético, mediante 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.

Se colocaron 600 u al 30% (p/v) de homogenato del tejido a analizar (hígado y musculo de forma separada), mezclado con butilhidroxitolueno (BTH) como antioxidante y ácido tricloroacético al 15%, se agito y se 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 a reaccionar con un volumen igual de ácido clorhídrico 0,25 N y tiobarbiturico (TBA) 0,375 %. La mezcla de reacción fue incubada nuevamente a 90 C durante 30 minutos, extraída del baño y enfriada, posteriormente, se puso a reaccionar con dos volúmenes de butanol, se centrifugo y la capa coloreada fue medida a 535 nm usando 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropano (Sigma) como el estándar.

1. Pesar 1 gr de tejido (mantener en hielo), usando papel aluminio rotulado.
2. Homogenizar el tejido con 3 ml de buffer fosfato (siempre en hielo).
3. Colocar en el primer juego de tubos.

<i>Tubos</i>	<i>buffer</i>	<i>BHT</i>	<i>H<sub>2</sub>O bd</i>	<i>TCA</i>	<i>Homogenato</i>
Bco.	600 ul	60 ul	20 ul	600 ul	
Bco-	600 ul	60 ul	20 ul	600 ul	
M <sub>1</sub>		60 ul	20 ul	600 ul	600 ul
M <sub>1</sub>		60 ul	20 ul	600 ul	600 ul

4. Tapar los tubos, usando tapas 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 juego 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 tapas con agujeros.
11. Vortear.
12. Incubar a 30' min. A 90 C
13. Colocar hielo
14. Agregar a cada tubo 1800 ul de butanol (bajo campana, usando barbijo y propipeta con guantes).
15. Tapar los tubos con tapas sin agujeros
16. Vortear 20'' seg.
17. Centrifugar a 10' min. A 2500 rpm
18. Separar el sobrenadante fucsia con pipeta y colocar en una cubeta rotulada (todo bajo campana), tapar la cubeta con tapa sin agujero.
19. Leer en el espectrofotómetro a 535 nm.

Una vez obtenidas las lecturas colorimétricas correspondientes a cada una de las muestras de homogenato de hígado y musculo esquelético, se calculó las concentraciones de MDA, mediante la fórmula que relaciona lecturas colorimétricas (A) con concentraciones de MDA conocidas (B), en una regresión de potencia, según la fórmula:

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

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

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

#### ***IV.8. Análisis estadístico***

Para analizar estadísticamente los resultados, se usó un ANOVA de dos vías: tratamiento de la madre (estrés prenatal) y tratamiento de la cría (estrés agudo postnatal). Cuando correspondió usar un test "a posteriori" se empleó el test de Duncan. Cuando fueron apropiadas las comparaciones post-hoc. Se consideraron diferencias significativas con un  $p < 0,05$ .

Para estudiar estadísticamente los resultados del índice adenosomático se usó un ANOVA de una vía: tratamiento de la madre (estrés prenatal).

## V. RESULTADOS

### V.1. Efecto del estrés prenatal sobre los niveles plasmáticos de Corticosterona en crías macho y luego de un estrés agudo por nado forzado

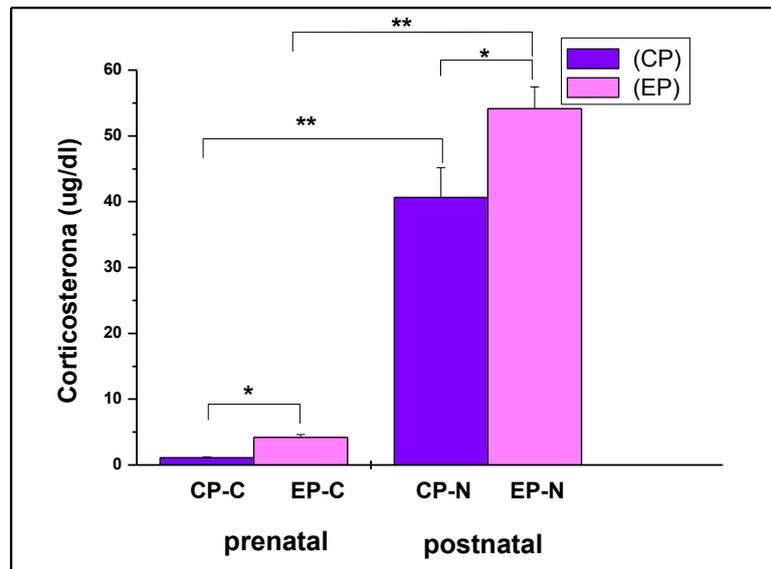


Fig. 21: Niveles de la Corticosterona plasmática ( $\mu\text{g/dl}$ ) en las crías macho adultas estresadas prenatalmente EP-C ( $n = 9$ ), en condiciones basales CP-C ( $n = 7$ ) y luego de la exposición al estrés agudo por nado forzado postnatal EP-N ( $n = 9$ ) y CP-N ( $n = 7$ ). Los niveles de COR fueron mayores ( $*p < 0,05$ ) en EP-C y EP-N comparados con sus respectivos controles CP-C y CP-N. Además, el estrés postnatal por nado CP-N y EP-N marco efectos significativos ( $**p < 0,005$ ) comparados con basales y prenatales CP-C EP-C. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M.

Se usó un ANOVA de dos vías: tratamiento de la madre (Estrés prenatal) y tratamiento de la cría (Estrés agudo por nado). Como test "a posteriori" se usó un test de Duncan. La corticosterona plasmática mostró un efecto significativo del tratamiento prenatal ( $F(1,28) = 52.23$ ;  $p < 0.021$ ) y postnatal ( $F(1,28) = 452.03$ ;  $p < 0.0019$ ). Se encontró interacción entre ambos factores ( $F(1,28) = 124.25$ ;  $p < 0.0021$ ).

Los niveles de COR plasmática fueron mayores en crías estresadas prenatalmente EP-C y pre y postnatalmente EP-N comparados con sus respectivos controles CP-C y CP-N. Además, el estrés postnatal por nado CP-N y EP-N marco efectos significativos comparados con basales y prenatales respectivamente CP-C; EP-C.

## V.2 Efecto del estrés prenatal y posnatal por nado sobre el Índice Adrenosomático

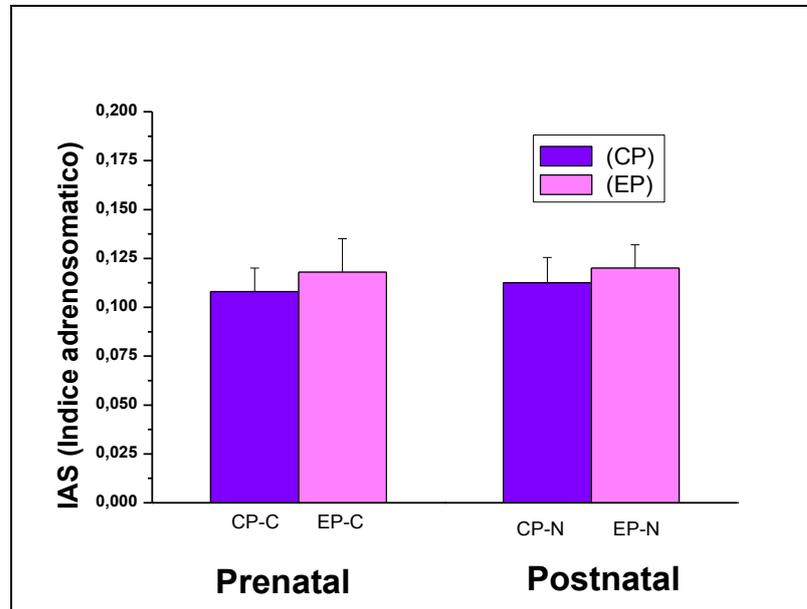


Fig. 22: El índice adrenosomático en las crías macho adultas estresadas prenatalmente EP-C ( $n=5$ ) y controles CP-C ( $n=5$ ) y luego de la exposición al estrés agudo postnatal EP-N y CP-N. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M.

El análisis estadístico ANOVA de dos vías, no mostró efecto significativo del tratamiento prenatal ( $F(1,16) = 0,035$   $p = 0,76$ ), ni del estrés postnatal ( $F(1,16) = 0,06$   $p = 0,93$ ).

El IAS no mostró diferencias significativas del tratamiento prenatal, estrés que recibieron las madres preñadas, ni del nado postnatal.

**V.3 Efecto del estrés prenatal sobre los niveles plasmáticos la Glucemia, en crías macho y luego de un estrés agudo por nado forzado.**

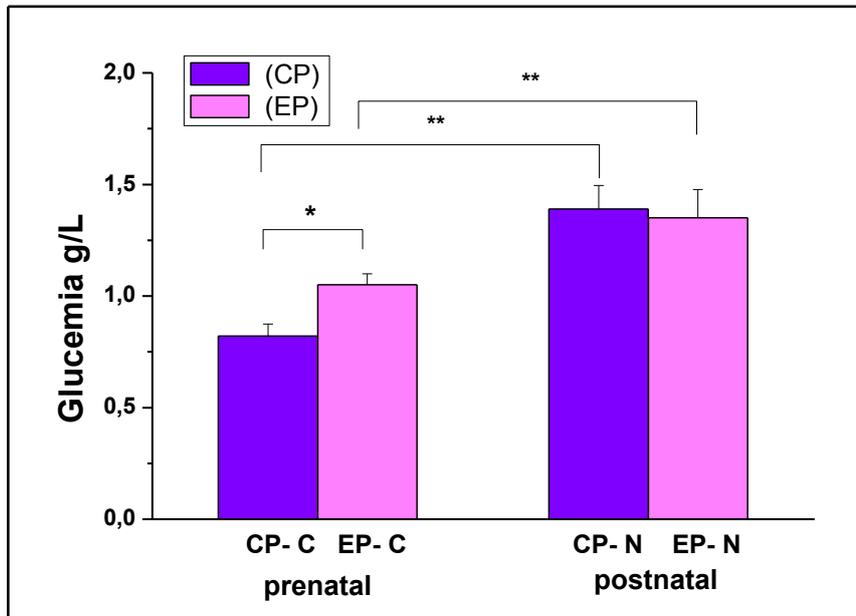


Fig. 23: Los niveles plasmáticos de Glucemia (g/l) en las crías macho adultas estresadas prenatalmente EP-C ( $n = 12$ ), en condiciones basales CP-C ( $n = 7$ ) y luego de la exposición al estrés agudo por nado forzado postnatal respectivamente EP-N ( $n = 11$ ), CP-N ( $n = 11$ ). Los niveles de Glucemia fueron mayores ( $*p < 0,05$ ) en EP-C comparado con su control CP-C. Además, el estrés postnatal por nado CP-N y EP-N marco efectos significativos ( $**p < 0,005$ ) comparados con basales y prenatales CP-C EP-C. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M.

El análisis estadístico realizado fue: ANOVA de dos vías, los efectos del estrés prenatal sobre la glucemia en las crías adultas muestran efecto significativo del tratamiento prenatal ( $F(1,37) = 19.53$   $p < 0,023$ ). La interacción fue significativa entre ambos factores ( $F(1,37) = 1.89$   $P = 0,0047$ ). El test "a posteriori" mostró que el estrés prenatal EP-C provocó un aumento significativo de los niveles basales de la glucosa plasmática ( $p < 0,02$ ) y que esa diferencia se pierde luego del estrés postnatal por nado ( $p = 0,77$ ). Además, el estrés postnatal por nado CP-N y EP-N marco efectos significativos comparados con basales y prenatales respectivamente CP-C; EP-C.

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

#### V.4 Efectos del estrés prenatal y nado postnatal sobre la concentración de Malondialdehído en hígado, en crías machos

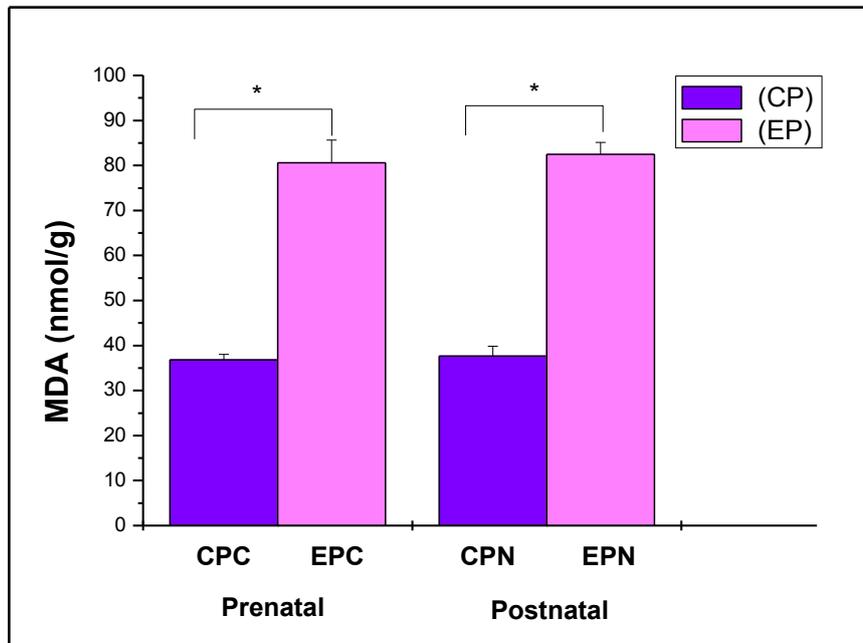


Fig. 24: Concentración de MDA en las crías machos adultas EP-C ( $n = 8$ ) y en condiciones basales CP-C ( $n = 6$ ), y luego de la exposición al estrés agudo por nado postnatal CP-N ( $n = 4$ ) EP-N ( $n = 5$ ). La concentración de MDA fue mayor ( $*p < 0,05$ ) en EP-C y luego de estrés postnatal por nado EP-N comparado con sus respectivos controles CP-C y CP-N. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M

Se usó un ANOVA de dos vías: el MDA mostro un efecto significativo del tratamiento prenatal ( $F(1,19) = 66.09457$ ;  $p < 0.01$ ) y postnatal ( $F(1,19) = 25.209$ ;  $p < 0.023$ ). La interacción ente ambos factores fue significativa ( $F(1,19) = 14.67$ ;  $p < 0.0063$ ).

La concentración de MDA en hígado como marcador del daño oxidativo fueron mayores en crías estresadas prenatalmente EP-C y cuando se aplicaron estrés pre y postnatal EP-N comparados con sus respectivos controles CP-C y CP-N.

### V.5 Efectos del estrés prenatal y nado postnatal sobre la concentración de Malondialdehído en músculo estriado, en crías machos

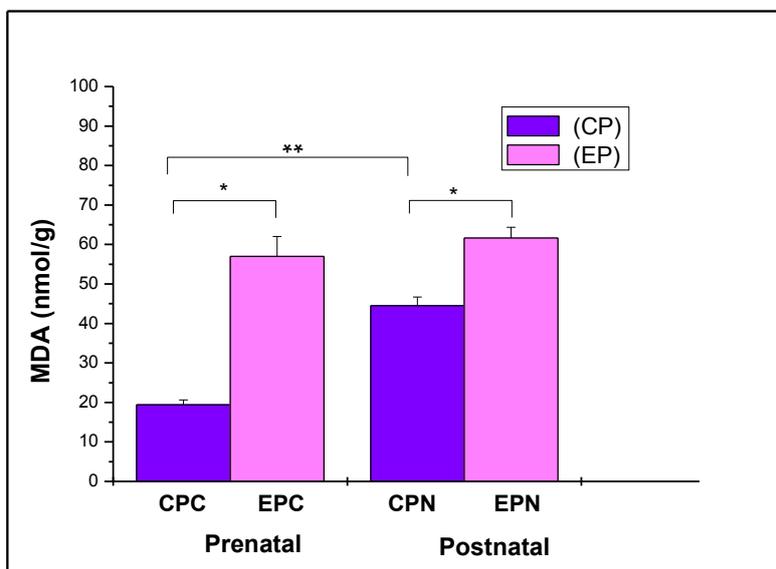


Fig. 25: Concentración de MDA en las crías machos adultas EP-C ( $n = 5$ ) y en condiciones basales CP-C ( $n = 4$ ), y luego de la exposición al estrés agudo por nado postnatal CP-N ( $n = 4$ ) EP-N ( $n = 5$ ). La concentración de MDA fue mayor ( $*p < 0,05$ ) en EP-C y luego de estrés postnatal por nado EP-N comparado con sus respectivos controles CP-C y CP-N. Además, el estrés postnatal por nado CP-N marco un efecto significativo ( $**p < 0,005$ ) comparado con basales CP-C. Cada barra representa la media  $\pm$  S.E.M

Se usó un ANOVA de dos vías: La concentración de MDA en músculo mostro un efecto significativo del tratamiento prenatal ( $F(1,14) = 36.0476$ ;  $p < 0.012$ ) y postnatal ( $F(1,14) = 28.1089$ ;  $p < 0.002$ ). La interacción ente ambos factores fue significativa ( $F(1,14) = 16.77$ ;  $p < 0.0043$ ).

La concentración de MDA en músculo como marcador del daño oxidativo fue mayores en crías estresadas prenatalmente EP-C como así también cuando se aplicó estrés prenatal y postnatal EP-N comparados con sus respectivos controles CP-C y CP-N. Además, el estrés posnatal por nado forzado mostró un aumento significativo en las concentraciones de MDA en músculo estriado de crías machos adultas con respecto a sus controles sin estrés prenatal.

## VI. DISCUSIONES

El estrés aplicado a las hembras gestantes reprograma el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) de la cría estresada prenatalmente (EP), generando la hiperactividad de este eje en el estado adulto.

Este eje neuroendocrino es uno de los más representativos en las diversas respuestas a estresores de diferentes índoles en los que está inmerso el organismo; desempeñando un papel crucial en los procesos controlados por este sistema.

Los niveles basales de la COR plasmática en los individuos expuestos a EP, son mayores que los correspondientes controles y está acompañada por una mayor actividad secretoria de las células adrenales de la región fascicular en estos animales (Mayer y col., 2010). Estos hallazgos coinciden con los encontrados por Huck (2014), Rabasa y col. (2011), Accorsi (2008), Bartolomucci (2004); Poltyrev (1996). La COR es un glucocorticoide liposoluble, que atraviesa la placenta e interactúa fuertemente con las diversas células y tejidos del feto; afectando el desarrollo adrenal del mismo y generando una mayor relación corteza: medula (Klemcke, 1995). Esto provoca efectos a largo plazo en las crías, influyendo en diversos sistemas; como el metabolismo, la función cardiovascular, entre otros. Ha habido una conciencia creciente de que muchos trastornos físicos y psicológicos comúnmente observados en la edad adulta, como la hipertensión, la diabetes y la depresión, tienen su origen en el desarrollo fetal (Calkins y Devaskar, 2011; Glover, 2011). La evidencia humana y animal ha informado convincentemente que la exposición al exceso de cortisol y la angustia psicológica prenatal materna (es decir, una amalgama de estrés subjetivo comórbido, ansiedad y estado de ánimo deprimido) altera la función de uno de los sistemas reguladores del estrés coactivos, el eje HHA (Kajantie, 2006; Seckl y Holmes, 2007; Kapoor y Matthews, 2008; Braun y Christopher, 2013).

Algunos autores sugieren que este aumento en la producción de COR puede haber sido provocada por una disminución de los receptores de mineralcorticoides (MR) presentes en el hipocampo de las crías (Maccari y col., 1995), alterando los mecanismos de retroalimentación del HHA. Esta disminución de los receptores de corticosteroides, se vería acompañada de una mayor secreción de GC, iniciando una resistencia a la retroalimentación negativa a los mismos.

Los GC generados por la corteza adrenal, modulan su propia concentración plasmática, a través de receptores presentes en el hipocampo. Los MR son los principales agentes del control por retroalimentación negativa de la secreción de GC adrenales bajo condiciones basales. Sin embargo, el incremento en niveles basales de COR y la consecuente

hiperactividad del eje, no se refleja en un aumento del tamaño de la glándula adrenal en los animales EP. En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio se observó que la corteza adrenal sufre cambios histológicos y fisiológicos, que se evidenciaron por un aumento de la relación Corteza-Médula animales expuestos a estrés prenatal (Mayer y col. 2010). El aumento de los niveles plasmáticos basales de la COR, que involucraría una resistencia a la retroalimentación negativa de los GC podría ser considerado como un marcador de la intensidad del estrés crónico en la rata (Karrow N 2006; Kapoor y Matthews, 2008; De Kloet y col., 2009).

Se encontró que la secreción de COR generada por el estrés en ratas preñadas, provoca una disminución de la cantidad de los receptores hipocampales MR, pero no de los receptores de glucocorticoides GR (Kapoor y Matthews, 2008; Karrow, N. 2006), en las crías EP adultas, en condiciones basales, o sea, que no han sido sometidas a un nuevo estresor. Los MR, están generalmente involucrados en la regulación constante de la liberación de la COR bajo condiciones basales (De Kloet y col., 2009), mientras que los GR son responsables de la regulación de los niveles de COR ante un estrés agudo postnatal.

Los glucocorticoides cruzan fácilmente las barreras biológicas, como la placenta (Seckl y Holmes, 2007) y ejercen una influencia directa sobre el desarrollo fetal. Aunque la enzima placentaria 11 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (11 $\beta$ -HSD2) regula la exposición fetal al convertir el cortisol en cortisona inactiva, estudios en humanos han indicado que el aumento del cortisol como consecuencia del estado depresivo y la posterior disminución de la eficacia de la placenta al convertir el cortisol en cortisona (Oberlander y col., 2008) puede llevar a una exposición elevada a cortisol en el útero. Dado que los receptores de cortisol están altamente expresados en el cerebro en desarrollo (Sánchez y col., 2000) y son importantes para la maduración del SNC en desarrollo (Kapoor y Matthews, 2008), la exposición prenatal a glucocorticoides puede alterar los mecanismos de retroalimentación del eje HHA fetal, lo que resulta en una función basal alterada y capacidad de respuesta en la descendencia (Kapoor y Matthews, 2008).

Existe un amplio consenso científico respecto de la importancia funcional y patológica de estos sistemas fisiológicos que se consideran típicos del estrés como la liberación de los GC y las catecolaminas (CA); dando origen a dos ejes de gran importancia en cuanto a la valoración biológica del estrés, el eje HHA y el eje simpático-adreno-medular (SAM).

Por otro lado, el efecto del estrés agudo postnatal, a nivel hipocampal, podría deberse a la acción del sistema nervioso noradrenérgico sobre este órgano, esto daría como resultado altos niveles de los GC maternos que modificarían la actividad del eje HHA en las crías,

por una acción sobre el desarrollo de los sistemas noradrenérgicos centrales de las mismas. En este sentido, se conoce que el EP aumenta el recambio de la NA y además el número de neuronas noradrenérgicas en el LC de ratas adultas (Darnaudéry y Maccari, 2008;) y que esta hormona ejerce un control inhibitorio directo sobre los GR hipocampales, facilitando y acelerando la secreción de COR ante cualquier estresor al que sea sometido la cría expuesta a EP. Por otro lado, la NA tiene más influencia sobre los GR que sobre los MR (Maccari y col., 1995; Seckl y Holmes, 2007; Karst y col., 2010). La activación metabólica provocada por la estimulación de ambos sistemas ya sea el HHA como el SAM es opuesta a los efectos generados por la insulina y por esa razón esta hormona es inhibida en situaciones de estrés; mediante un efecto alfa adrenérgico directo sobre las células beta del páncreas.

Luego del estrés agudo postnatal por NF en ratas EP, se observó hiperactividad del HHA. La regulación de la anormal retroalimentación del eje HHA en las crías EP, estaría asociada con la disminución del número GR, que como ya dijimos son los involucrados, fundamentalmente, en la respuesta al estrés agudo (De Koenig y col., 2005; Maccari y col., 2003). Esto representa una alteración del eje HHA mucho más intensa en estos animales. Una respuesta en igual sentido fue encontrada por Armario (2004). Además, en esta investigación se registró un aumento de la ACTH plasmática significativamente mayor en los animales EP que en sus CP, luego del estrés agudo.

Cuando hay niveles elevados de COR en la rata, tales como, los que observamos durante el NF agudo, los receptores que se van ocupando son los GR (De Kloet, 2005). Estos aspectos mencionados anteriormente, nos permitirían entender los resultados de nuestros experimentos en los que se observa un aumento del pico de COR en los animales EP, sometidos en el estado adulto, a un estrés agudo heterotípico. Coincidiendo con nuestros resultados, estos estudios (Hove y col., 2014; Wilson y col., 2013), muestran que la exposición al estrés durante las dos últimas semanas de la preñez no produce una adaptación de la cría a la aplicación de un estrés heterotípico en la edad adulta postnatal, sino una hiperactividad en comparación con sus pares sin EP cuya exposición al NF si bien produjo un aumento significativo de la COR plasmática, fue menor que la hallada en ratas con EP.

Los animales EP mostraron una hiperglucemia basal en nuestros experimentos. Estos resultados son coincidentes con los obtenidos en otros estudios (Rabasa y col., 2011), en animales sometidos prenatalmente a IMO, en un ambiente iluminado, durante la última semana de gestación. Esta hiperglucemia en nuestras ratas EP, podría ser el resultado de la hiperactividad basal del eje HHA, ya que hubo correlación positiva entre los niveles de

la COR plasmática y la glucemia. Los mecanismos por los cuales la COR genera hiperglucemia son varios, entre ellos se encuentra la disminución de la sensibilidad de los tejidos para la captación de este azúcar. La utilización de la glucosa a nivel intracelular también se ve afectado por la COR, donde la misma reduce la oxidación de nicotinamida adenina dinucleotido reducido (NADH) a nicotinamida adenina dinucleotido oxidado (NAD<sup>+</sup>). Es sabido que el NAD<sup>+</sup> es necesario para que la glucólisis se lleve a cabo y la glucosa no se acumule en la célula.

Sin embargo, parte de nuestros resultados podría ser también la consecuencia de la activación sostenida del eje SAM en las crías EP, en su estado adulto. Como consecuencia de ello se libera A, hormona conocida por su efecto hiperglucemiante. Esta hormona opera de dos formas: acelerando la velocidad de la glucogenólisis hepática, liberándola a la sangre. Y la otra tiene que ver con el efecto lipolítico sobre los adipocitos, provocando un aumento de los ácidos grasos en sangre y su posterior utilización en las diversas células del organismo, generando como consecuencia un ahorro de glucosa. Esto produce un aumento de glucosa en sangre.

El aumento de la glucemia, observado tanto en los animales EP como en sus respectivos controles CP, en respuesta a un estrés agudo preponderantemente psicofísico como es el NF; parece ser el resultado inmediato de la activación de la SAM, con la subsiguiente liberación de A (Lesage y col. 2004). Este efecto probablemente esté mediado por receptores adrenérgicos  $\alpha_2$ . Por lo pronto, en nuestros experimentos la aplicación del NF agudo genera una hiperglucemia que elimina las diferencias basales entre grupos EP y CP. Este hallazgo se debe a que los animales del grupo CP responden a la aplicación del estrés agudo con un aumento mayor de la glucemia basal que los animales EP. La correlación entre la COR y la glucemia fue positiva ( $r = 0,7559$ ,  $P < 0,0001$ ). Por otro lado, la activación metabólica provocada por los sistemas SAM y HHA es opuesta a los efectos de la insulina y es por esa razón que en las situaciones de estrés puede inhibir la secreción de insulina, al parecer mediante un efecto  $\alpha$  adrenérgico directo, a nivel de las células  $\beta$  del páncreas (Ganong, 2010).

Es conocido que la hiperglucemia, es un buen marcador de la intensidad del estrés en la rata. Existen evidencias de que las ratas que han sido sometidas a un determinado EP captan este mismo estrés, en la vida adulta, con una menor intensidad (Armario y col., 1988, De Boer y col., 1989, Marquez y col., 2004). Como consecuencia de ello, la respuesta hiperglucemiante general es menor siempre que se repita en mismo estrés. En nuestro caso, el efecto en las ratas del estrés postnatal por nado es distinto al del estrés prenatal por IMO por lo tanto no se encuentra diferencia en la intensidad entre CP-N y EP-

N. Este marcador de estrés agudo se puede utilizar para investigar diferencias individuales en la respuesta de los animales al estrés. El origen de esas discrepancias individuales podrían ser los factores genéticos o epigenéticos (ambientales), entre los que se cuenta la exposición de las madres gestantes a situaciones estresantes como ocurre en nuestros estudios. En conclusión, la regulación del eje HHA y del SAM en la cría adulta, produce una alteración de la regulación de la glucemia.

En la actualidad se define al EO como, el desequilibrio bioquímico producido por la exacerbada producción de ROS y RL, que no pueden ser contrarrestados por sistemas antioxidantes, provocando daño oxidativo a las biomoléculas. Una de las consecuencias del EO descontrolado (desequilibrio entre el pro-oxidante y los niveles de antioxidantes) es producir lesiones de células, tejidos y órganos causado por daño oxidativo. Hace tiempo que se reconoce que altos niveles de ROS puede infligir daño directo a los lípidos. Los dos ROS más frecuentes que pueden afectar profundamente los lípidos son principalmente: radical hidroxilo ( $\text{HO}\cdot$ ) e hidroperoxilo ( $\text{HOO}\cdot$ ). Los radicales hidroxilos causan daño oxidativo a las células porque atacan de forma inespecífica las biomoléculas, ubicadas a pocos nanómetros de su sitio de generación (Halliwell y Guttridge, 1984) y están involucrados en trastornos celulares como la neurodegeneración (Venero y col., 2003), enfermedad cardiovascular (Lipinski y Pretorius, 2012) y cáncer (Dizdaroglu y Jaruga, 2012).

El estado redox tanto a nivel intra celular como supracelular y tisular, es un fenómeno complejo que se puede cuantificar a través de una serie de biomarcadores del EO.

Con el fin de confirmar su producción o aclarar su función, los investigadores a menudo tienen que buscar productos finales o subproductos de reacciones inducidas por RL, examinando el "camino" de reacción de los radicales. Un ejemplo es la medición de productos (cuantitativamente) menores de la peroxidación de lípidos, como el MDA en los tejidos, o el pentano en el aliento exhalado.

Entre los muchos aldehídos diferentes que se pueden formar como productos secundarios durante la peroxidación lipídica, el MDA parece ser el producto más mutagénico de la peroxidación lipídica, mientras que el 4-HNE es el más tóxico.

El MDA ha sido ampliamente utilizado durante muchos años como un óptimo biomarcador de la peroxidación lipídica, tanto sea de ácidos grasos omega-3 y como omega-6, debido a su reacción fácil con TBARS. Es además, uno de los más populares y confiables marcadores que determinan el EO en situaciones clínicas (Giera y col., 2012).

La alta reactividad de MDA se basa principalmente en su electrofilia; cuando el pH celular disminuye (transformándolo en beta-hidroxi-acroleína), lo hace fuertemente reactivo hacia

los nucleófilos, tales como residuos de aminoácidos básicos (es decir, lisina, histidina o arginina); generando aductos de base de Schiff (Pizzimenti y col., 2013). La degradación metabólica de MDA termina en la producción de acetaldehído; la unión entre este y el MDA presente genera aductos malondialdehído acetaldehído (MAA) (Tuma, 2002). Estos aductos de MAA se muestran como altamente inmunogénico (Wang y col., 2012), proinflamatorio; pero además pueden participar en reacciones secundarias deletéreas para la célula (Cheng y col., 2011). En la actualidad la producción de MDA/MAA se considera un factor de progresión de aterosclerosis y otras enfermedades, tanto metabólicas como autoinmunes (Duryee y col., 2011).

La producción de MDA en músculo estriado esquelético e hígado ha sido estudiada por otros autores con objetivos y resultados similares. Sachdev y Davies (2007), analizaron homogeneizados de músculo e hígado de ratas expuestas a períodos de ejercicio exhaustivo. Encontraron más de un 100% de aumento en los niveles de MDA hepático y muscular en ratas que fueron alimentadas con una dieta control y expuestas a una rutina de ejercicios exhaustiva. Si bien diferentes estudios han investigado la respuesta del músculo esquelético trabajando ejercicios agudos y entrenamientos a largo plazo, se sabe menos acerca de las adaptaciones hepáticas durante y después del aumento de la actividad física. El hígado juega un papel importante durante el ejercicio a través de la liberación de glucosa al torrente sanguíneo y la gluconeogénesis y las mitocondrias son claramente importantes en el rendimiento del ejercicio debido a la producción de energía aeróbica. Mientras que el entrenamiento físico parece mejorar la modulación del metabolismo oxidativo, los episodios de ejercicio agudo desafían las defensas antioxidantes del cuerpo con una alta producción de ROS, trayendo aparejado el deterioro del rendimiento. Situaciones competitivas y de torneo caracterizadas por los breves intervalos de recuperación entre series de ejercicio exigentes pueden aumentar la producción de ROS a corto plazo frente a la adaptación al entrenamiento. En este sentido, los estudios que apuntan a identificar las adaptaciones hepáticas mitocondriales al estrés oxidativo, relacionando la repetición de ejercicio extenuantes, como estímulos estresantes repetidos, son aún incipientes.

El hecho que el ejercicio agudo represente, a corto plazo, un estímulo para aumentar el EO, se debe al aumento en el consumo de oxígeno ( $VO_{2max}$ ) durante el ejercicio aeróbico, influyendo en la producción de marcadores de EO. El ejercicio aeróbico agudo genera ROS, creando una perturbación en el transporte de electrones y una excesiva producción de radical superóxido. También se ha registrado aumentos de ROS en estresores físicos de sobrecarga (anaeróbicos o supra máximos), pudiendo ser la

consecuencia de los diversos micro desgarros y/o lesiones mecánicas a lo largo de la fibra muscular; provocando proteólisis, inflamación, y un desequilibrio en la homeostasis del calcio (Cunningham y col., 2005). Otras investigaciones también apoyan la hipótesis de que el ejercicio agudo causa estrés oxidativo y mitocondrial en tejido muscular y hepático, con un aumento de MDA mitocondrial, aumento de los niveles de carbonilación proteica y una mayor producción de ROS después de una única sesión de nado exhaustivo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en la determinación del MDA en hígado, podemos determinar que tanto en los grupos CP-C como EP-C, el nado forzado no incremento significativamente los valores de MDA en crías machos adultas, en este tejido. El MDA en condiciones basales de por sí, son significativamente mayores en los grupos EP-C que CP-C, revelando un mayor estrés oxidativo y sensibilidad a nivel hepático, causada por el estrés prenatal por IMO (80 nmoles/g vs. 35 nmoles y 55 nmoles/g vs. 20 nmoles/g; respectivamente). Estos resultados coinciden con los obtenidos por Brun (2015), donde midió la concentración de MDA en homogenatos de hígado de ratas expuestas a EP, y se pudo registrar un aumento en las concentraciones de esta y el efecto significativo del tratamiento prenatal en comparación con animales CP.

La aplicación del nado forzado como estrés post natal, no registro un aumento significativo de MDA en el tejido hepático en los grupos con EP, contrastado con otro estudios donde el nado forzado como estresor agudo si causo impacto a nivel de TBARS, en ratas machos Wistar; interpretando que para este grupo con hipersensibilización del eje HHA, el estímulo del NF no reflejo un aumento en los valores de MDA; admitiendo que si logro aumentar levemente los niveles en muy poco tiempo.

Por otro lado, las determinaciones en el musculo estriado voluntario del tríceps sural (grupo muscular con miofibrillas de las isoformas tipo I o comúnmente llamadas lentas), registraron un aumento significativo en los niveles de MDA en el grupo CP-N comparado con los CP-C, luego de la aplicación del NF, subiendo de 20 nmoles/g a 45 nmoles/g. Por otra parte, en los individuos con EP, el NF no provoco un aumento de MDA en musculo.

Estos valores de MDA en tejido muscular estriado voluntario, coinciden con los valores detectados por Stover (2005); donde después de un ejercicio intenso del tipo anaeróbico (series de velocidad de 30" a 30 metros por segundo y una inclinación de 15°), la concentración de MDA se elevó en el músculo extensor largo (EDL), en comparación con el grupo control, indicando un aumento en la peroxidación lipídica en las fibras musculares de tipo II, o también llamadas rápidas; no así en las fibras lentas. En el mismo estudio se ha sido sugerido que el EO podría ser inducido por el ejercicio agudo de alta intensidad,

aplicado como un estrés único en el tiempo; ya que el daño oxidativo provocado por el ejercicio en los tejidos podría reducirse a través del entrenamiento de alta intensidad a largo plazo; ya que luego de un régimen de entrenamiento la concentración de MDA en el musculo extensor largo (EDL) fue significativamente menor en los ratones entrenados en comparación con la concentración encontrada en el grupo control no entrenado (lo que sugeriría que hubo una disminución en la peroxidación lipídica, Cunningham y col., 2010). Estos resultados también fueron registrados en otros protocolos de estresores físicos agudos del tipo anaeróbico; donde la oxidación de lípidos fue mayor en ratas expuestas a un solo esprint (carrera de velocidad máxima) de un minuto a un ritmo de 45 m/min; elevando los hidroperóxidos lipídicos y las sustancias reactivas al ácido tiobarbiturico (TBARS) en el músculo esquelético. Estos resultados también fueron vistos en seres humanos, donde el ejercicio físico agudo del tipo intercalado (seis series de velocidad de 150 metros), provocó un aumento en los niveles plasmáticos del marcador de peroxidación de lípidos, MDA (Cunningham y col., 2010).

Las causas que subyacen en estas diferencias entre estresor agudo y exposición sistemática (entrenamiento), indican que este último aumenta la actividad de glutatión peroxidasa (GPx) y glutatión reductasa (GR), ambos antioxidantes intracelulares, aumentan significativamente luego de un entrenamiento de velocidad y en un entrenamiento de resistencia regular, lo que ayuda a la prevención del aumento desproporcionado de la peroxidación lipídica durante el ejercicio (Meister, 1983). Se ha comprobado que el contenido de glutatión (GSH), principal antioxidante contra los ROS aumenta en las células musculares pertenecientes a los miembros posteriores de perros y ratas, sometidos a un entrenamiento de resistencia (Wu y col., 1999; Kelly y col., 2004).

Por último, debemos mencionar la diferencia notoria entre estresores físicos agudos y únicos en el tiempo y el entrenamiento como un conjunto de estresores óptimamente dosificados en el tiempo. Ya que diversos autores han encontrado una mejora en la respuesta adaptativa hacia el estrés físico, mejorando la relación GSH / GSSG, actividad MnSOD, viabilidad mitocondrial y Dy y disminuciones en los niveles de TBARS en animales entrenados, expuestos a esfuerzos repetidos durante varias semanas. Estos hallazgos experimentales sugieren que el ejercicio agudo causa la generación de ROS mitocondrial y que este desbalance oxidativa puede beneficiarse activando los sistemas de defensa antioxidante, durante los programas de entrenamiento físico en ratas (Lima y col., 2013), puede registrarse un aumento en las mitocondrias musculares después del entrenamiento de resistencia y la expresión alterada de una gran cantidad de genes nucleares y mitocondriales, que inducen a mayor eficiencia en el funcionamiento de la

fosforilación oxidativa. Esta biogénesis mitocondria podría ser en gran medida responsable del aumento de la capacidad de resistencia y la capacidad antioxidante, responsable de los procesos que disminuyen el estrés oxidativo intracelular y tisular. Esta respuesta adaptativa tiene justificación en la mayor producción de NAD<sup>+</sup> (nicotina adenina dinucleótido), por parte de la cadena de fosforilación oxidativa ocurrida dentro de la mitocondria, funcionando como aceptor y sustituto en la peroxidación de lípidos y otras moléculas (ácidos nucleicos). La expresión de estos genes, puede ser inducido rápidamente por exposición sistémica a diversos estresores; como el frío, ejercicio agudo y ayuno. Todas estas pueden considerarse como situaciones fisiológicas que aumentan la demanda mitocondrial de energía en forma calórica o química, y por lo tanto son considerados estímulos que promueven la biogénesis mitocondrial y la mejora en el funcionamiento antioxidante (Wright y col., 2007). Probablemente la actividad física del musculo en un ejercicio agudo sea insuficiente para generar esta mejora en el funcionamiento antioxidante.

## VII. CONCLUSIONES

- ✓ El estrés prenatal por IMO crónico produce, durante la vida adulta, alteraciones en las condiciones basales del eje HHA, siendo la secreción de COR y sus niveles séricos significativamente elevados en los animales EP, hecho que sugiere hiperactividad del eje HHA.
- ✓ En los machos adultos EP provenientes de madres sometidas a IMO crónico, el estrés agudo desencadenado por la prueba de nado forzado se manifiesta por una mayor secreción de COR, indicando hipersensibilización del eje HHA y reconocimiento de un estrés diferente.
- ✓ El estrés prenatal por IMO crónico produce crías que durante su vida poseen hiperglucemia. Un estresor físico del tipo agudo como el NF, muestran una respuesta hiperglucemiante similar tanto en animales controles como en EP.
- ✓ El estrés prenatal por IMO crónico, produce un aumento del estrés oxidativo de las crías, en el tejido hepático.
- ✓ El estrés prenatal por IMO crónico y el estrés agudo NF, genera en un aumento del estrés oxidativo en el musculo estriado voluntario de las crías adultas. El estrés oxidativo es mayor en animales EP sometidos a NF en su vida adulta, reflejado en una mayor producción de moléculas terminales de la peroxidación lipídica (MDA).

## VIII. PERSPECTIVAS

Hasta ahora nos hemos concentrado en las respuestas a una sola sesión de ejercicio agudo. Sin embargo, existen efectos adaptativos diferentes en cuanto a la exposición crónica y dosificada (entrenamiento) a los estresores físicos regulares. Sin embargo, en nuestra investigación hemos llegado a afirmaciones concretas con respecto a una exposición prenatal (IMO), y su relación con respecto a estresores post natales percibidos en la vida adulta, en este caso ejercicio físico agudo, continuo de 20', por nado forzado (NF).

- Determinar parámetros de la regulación de la glucemia y estrés oxidativo en ratas macho EP por IMO y sometidas a un estrés crónico por nado.
- Profundizar el estudio en Estrés oxidativo en hígado y músculo frente a un estrés crónico por nado.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Abel EL (1993)** Physiological effects of alarm chemosignal emitted during the forced swim test. *J Chem Ecol.* 19:2891-901
- Accorsi P**, Carloni E, Valsecchi P, Viggiani R, Gamberoni M, Tamanini C, Seren E (2008) Cortisol determination in hair and faeces from domestic cats and dogs. *Gen Comp Endocrinol* 155:398-402.
- Adcock I (2000)** Molecular mechanisms of glucocorticosteroid actions. *Pulm Pharmacol Ther.* 13:115-26.
- Adcock I (2003)** Glucocorticoids: new mechanisms and future agents. *Curr Allergy Asthma Rep.* 3:249-57.
- Aguilar C**, Zapata N, Grajales P, Gracia D (2006) Ejercicio físico y Sistema inmune. *Iatreia* vol.19 no.2 Medellín Apr./June 2006. Scielo.
- Akana SF**, Shinsako J, Dallman MF (1983) Drug induced adrenal hypertrophy provides evidence for reset in the adrenocortical system. *Endocrinol.* 113:2232–2237.
- Alessio H**, Goldfarb A, Cutler R (1988) MDA content increases in fast- and slow-twitch skeletal muscle with intensity of exercise in a rat. *Am J Physiol.* 255: 874-877.
- Alessio H**, Hagerman A, Fulkerson B, Ambrose J, Rice R (2000) Generation of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. *Med Sci Sports Exerc* 32: 1576–1581.
- Alkalay A**, Pomerance J, Rimoin D (1987) Fetal varicella síndrome. *J Pediatr.* 111:320-323.
- Amdur R**, Liberzon I (2001) The structure of posttraumatic stress disorder symptoms in combat veterans: a confirmatory factor analysis of the impact of event scale. *J Anxiety Disord.* 15:345-357.
- Amugongo S**, Hlusko L (2014) Impact of maternal prenatal stress on growth of the offspring. *Aging Dis* 5:1-16.
- Armario A**, Daviu N, Muñoz A, Rabasa C, Fuentes S, Belda X, Gagliano H, Nadal R (2012) What can we know about pituitary hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors?. *Cell. Mol. Neurobiol.* 32:749-758.
- Arquer A**, Elousa R, Marrugat J (2010) Actividad física y estrés oxidativo. *Apunts. Medicine de l'Esport.* 45: 31-40
- Arteel GE (2003)** Oxidantes y antioxidantes en la enfermedad hepática inducida por el alcohol. *Gastroenterol J.* 124:778-790.

**Ascensão A**, Ferreira R, Magalhães J (2007) Exercise-induced cardioprotection-biochemical, morphological and functional evidence in whole tissue and isolated mitochondria. *Int J Cardiol.* 117:16-30.

**Aydin C**, Ince E, Koparan S, Cangul T, Nazinoroglu M, Ak F (2007) Protective effects of long term dietary restriction on swimming exercise-induced oxidative stress in the liver, heart and kidney of rat. *Cell Biochem Funct* 2007. 25: 129–137.

**Bahamondes G** (2011) Estrés crónico intermitente aplicado en ratas durante el período de gestación induce “programming” sobre el tejido cardíaco en la descendencia de ratas machos.

**Barbany J.** Fisiología del ejercicio físico y del entrenamiento (deportes). 1era Edición. Editorial Paidotribo. Año de edición: 2002. ISBN: 8480195894. Páginas: 192.

**Barbany J.** Fisiología del ejercicio físico y del entrenamiento. 2da Edición. Editorial Paidotribo. Año de Edición: 2014. ISBN: 8480195894. Páginas: 192.

**Barbazanges A**, Piazza PV, Moal ML, Maccari S (1996) Maternal glucocorticoid secretion mediates long-term effects of prenatal stress. *J Neurosci.* 16: 3943–3949.

**Barker D** (1992) Fetal and infant origin of adult disease. *J British Medicine.* 80:305-307.

**Barker D** (1999). Early growth and cardiovascular disease. *Arch Dis Child.* 80:305-7.

**Barnes P** (1998) Anti-inflammatory actions of glucocorticoids: molecular mechanisms. *Clin Sci (Lond).* 94:557-72

**Barnes P** (2001) Corticosteroids, IgE, and atopy. *J Clin Investig.* 107: 265-266.

**Bartolomucci A**, Pederzani T, Sacerdote P, Panerai AE, Parmigiani S, Palanza P (2004) Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology* 29:899-910.

**Belaya Z**, Iljin A, Melnichenko G, Rozhinskaya L, Dragunova N, Dzeranova L, Butrova S, Troshina E (2012) The diagnostic performance of salivary cortisol late at night as measured by automated electrochemiluminescence immunoassay in obese and overweight patients referred to excludes Cushing's syndrome. *Rev. Endocrinología* 41:494–500.

**Belenguer A**, Abdelazizb K, Zaragoza J, Blascob C, Aguilarc P, Ribes J (2015) El estrés oxidativo como predictor de longevidad; estudio de casos y controles. *Rev Esp Geriatr Gerontol.* 50:16-21.

**Benoit P**, Cheng F, Bouring M (2005) Natación forzada en ratones: una revisión sobre la actividad de los antidepresivos. *Psicofarmacología.* 177 : 245-255.

**Bertolin L**, MULLOL J, Prado M, Ferrer J, Alobid I, Picado C, Pujols L (2015) Efectos de los lipopolisacáridos en la función de los receptores de glucocorticoides en el control de la producción de fibroblastos de la mucosa nasal. *PLoS One*. 10(5): e0125443.

**Biomarkers Definitions Working, G. (2001)** Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework, *Clin. Pharmacol. Ther.* 69 89–95.

**Bloomer RJ (2008)** Effect of exercise on oxidative stress biomarkers. *Adv Clin Chem.* 46:1-50.

**Bloomer RJ**, Falvo M, Fry A, Schilling B, Smith W, Moore C (2006) Oxidative stress response in trained men following repeated squats or sprints. *Med Sci Sports Exerc.* 38:1436-1442.

**Bloomer RJ, Goldfarb A (2004)** Anaerobic exercise and oxidative stress— a review. *Can J Appl Physiol.* 29:245-263.

**Bosch OJ**, Musch W, Bredewold R, Slattery DA, Neumann ID (2007) Prenatal stress increases HPA axis activity and impairs maternal care in lactating female offspring: implications for postpartum mood disorder. *Psychoneuroendocrinology* 32: 267–278.

**Botelho de Oliveira S**, Conde AC (2011) Memoria emocional y trastorno por estrés postraumático en el contexto del desplazamiento en Colombia. *Rev Colomb Psiquiatr.* 40:457-69.

**Botezelli J**, Cambri L, Ghezzi A, Dalia R, Scariot P (2011) Different exercise protocols improve metabolic syndrome markers, tissue triglycerides content and antioxidant status in rats. *Diabetol Metab Syndr* doi: 10.1186/1758-5996-3-35.

**Brann DW (1995)** A major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology.* 61: 213–225.

**Braun AB**, Christopher KB (2013) Vitamin D in acute kidney injury. *Inflamm Allergy Drug Targets.*12:262–272.

**Brooks S**, Vasilaki A, Larkin L, McArdle A, Jackson M (2008) Repeated bouts of aerobic exercise lead to reductions in skeletal muscle free radical generation and nuclear factor kappaB activation, *J. Physiol.* 586. 3979–3990.

**Buege JA**, Aust SA (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52:302-310

**Cakir B**, Kasimay O, Ersoy Y, Ercan F, Yegen B (2010) Stress-induced multiple organ damage in rats is ameliorated by the antioxidant and anxiolytic effects of regular exercise. *Cell Biochem Funct* 28: 469–479.

**Calkins K**, Devaskar SU (2011) Fetal origins of adult disease. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care.* 41:158-176.

- Calogero A (1988)** Regulation of rat hypothalamic CRH secretion *in vitro*, potential clinical implications. In: Mechanism of physical and emotional stress. New York. Plenum Press 83-105.
- Cambra G (2009)** Stress and chronic pain: An endocrine perspective. *Reumatol Clin.* 5:12-4.
- Campion J, Milagro F, Martinez J (2010)** Epigenetics and Obesity. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 94: 291-347.
- Camps D,** Bioquímica del estrés oxidativo. Año de edición: 2010. Diego Camps 1ª Edición. ISBN: 9780557078202. Pág: 70.
- Cannon W (1929)** Bodily changes in pain, hunger, fear and rage. *Am J Psychiatry* 86:770–771.
- Casado A, López-Fernández E, Castellanos A (2014)** Physical exercise decreases work and oxidative stress in emergency professionals. *Rev Lab Clin.* 7:96-103.
- Corrales L, Ariza M (2012)** Estrés oxidativo: origen, evolución y consecuencias de la toxicidad del oxígeno. Publicación científica en ciencias biomédicas. Issn: 1794-2470. Vol. 10 N°18. 135-250.
- Chapman RH, Stern JM (1978)** Maternal stress and pituitary-adrenal manipulations during pregnancy in rats: effects on morphology and sexual behavior of male offspring. *J Comp Physiol Psychol.* 92:1074-1083.
- Cheeseman K, Slater T (1993)** An introduction to free radical biochemistry. Free radicals in medicine. Churchill Livingstone 481-493.
- Chen Cárdenas SM, Mayer N, Romanini M, Rolando A, Liaudat A, Brun N, Vivas A, Gauna H, Rodríguez N (2013)** Reproductive response in offspring male rats exposed to prenatal stress and to early postnatal stimulation. *Rev Internacional Morfología.* 31:754-764.
- Cheng J, Wang F, Yu D, Wu P, Chen J (2011)** The cytotoxic mechanism of malondialdehyde and protective effect of carnosine via protein cross linking/mitochondrial dysfunction/reactive oxygen species/MAPK pathway in neurons. *Eur J Pharmacol.* 650:184–194.
- Chrousos G (2000)** Stress: responses and function of the Immune System, Clinical Implications. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 917: 38-67.
- Chrousos G, Loriaux D, Gold P (1988)** Mechanisms of Physical and Emotional Stress.
- Cobley J, Sakellariou G, Owens D, Murray S, Waldron S, Gregson W, Fraser W, Burniston J, Iwanejko L, McArdle A, Morton J, Jackson M, Close G (2014)** Lifelong

training preserves some redox-regulated adaptive responses after an acute exercise stimulus in aged human skeletal muscle, *Free Radic. Biol. Med.* 70. 23–32.

**Cobley J**, Moulton P, Burniston J, Morton J, Close G (2015) Exercise improves mitochondrial and redox-regulated stress responses in the elderly: better late than never! *Biogerontology* 16. 249–264.

**Codina O**, Elosua R, Marrugat J (1999) Physical activity and arteriosclerosis. The effects of physical activity on lipid oxidation, hemostasis and endothelial function. *Med Clin.* 112:508-15.

**Corrêa H**, Duval F, Mokrani M, Bailey P, Trémeau F, Staner L, Diep TS, Hodé Y, Crocq MA, Macher JP (2000) Prolactin response to d-fenfluramine and suicidal behavior in depressed patients. *Psychiatry Res* 93: 189-99.

**Cryan F**, Markou A, Lucky I (2002) Evaluación de la actividad antidepressiva en roedores: desarrollos recientes y necesidades futuras. *Tendencias en ciencias de la farmacología.* 23: 238-245.

**Cunningham P**, Geary M, Harper R, Pendleton A, Stover S (2005) High intensity sprint training reduces lipid peroxidation in fast-twitch skeletal muscle. *J Exerc Physiol Online* 8:18-25.

**Dantzer R** (1997) Stress and immunity: what we have learned from psychoneuroimmunology. *Physiology Act of Scandinavia* 161: 43-46.

**Dantzer R**, Kelley W (1989) Stress and immunity: an integrated view of the relationships between stress and the immune system. *Life sci.* 44: 59-100.

**Davies K**, Quintanilha A, Brooks G, Packer L (1982) Free radicals and tissue damage produced by exercise, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 107. 1198–1205.

**Davies K**, Doroshov J (1983) Mitochondrial NADH dehydrogenase-catalyzed oxygen radical production by adriamycin, and the relative inactivity of 5-iminodaunorubicin. *FEBS Lett.* 153: 227-30.

**Davies K**, Lin S (1988) Oxidatively denatured proteins are degraded by an ATP-independent proteolytic pathway in *Escherichia coli*. *Free Radic Biol Med.* 5: 225-36.

**Davies K**, Packer L (1981) Biochemical adaptation of mitochondria, muscle, and whole-animal respiration to endurance training. *Arch Biochem Biophys.* 209: 539-54.

**De Boer SF**, Van der Gugten J, Slangen J (1989) Plasma Catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in rats. *Physiol Behav* 45:789–795.

**De Kloet ER**, Fitzsimons CP, Datson NA, Meijer OC, Vreugdenhil E (2009) Glucocorticoid signaling and stress-related limbic susceptibility pathway: about receptors, transcription machinery and microRNA. *Brain Res.* 1293:129-141.

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

**De Nicola F (2015)** Mecanismos neuroendocrinos de respuesta durante el estrés y la carga alostática. laboratorio de bioquímica neuroendocrina, instituto de biología y medicina experimental-conicet, departamento de bioquímica humana, facultad de medicina, uba. [www.ri.conicet.gov.ar](http://www.ri.conicet.gov.ar)

**Detke M**, Lucki I (1995) Detection of serotonergic and noradrenergic antidepressants in the forced swimming test in rats: the effects of water depth. *Behav Brain Res.* 73:43-46.

**Dhabhar FS**, McEwen B (2001). Bidirectional effects of stress & glucocorticoid hormones on immune function: possible explanations for paradoxical observations. *Psychoneuroimmunology* 3:301–38.

**Dhabhar FS**, McEwen B (2007) Bidirectional effects of stress on immune function: possible explanations for salubrious as well as harmful effects.4:723–60.

**Dhabhar FS**, McEwen B, Spencer R (1993) Stress response, adrenal steroid receptor levels, and corticosteroid-binding globulin levels a comparison between Sprague Dawley, Fischer 344, and Lewis rats. *Brain Res.* 16: 89–98.

**Díaz R**, Barba F (2016) Prenatal stress and its effects on neurodevelopment. *Rev Clinica Las Condes.* 27:441-446.

**Dizdaroglu M**, Jaruga P (2012) Mechanisms of free radical induced damage to DNA. *Free Radic Res.* 46:382–419.

**Duval F**, González F, Rabia H (2010) Neurobiología del estrés. *Rev Chilena Neuropsiquiatría* 48:307-318.

**Duenas Z (2012)** Efectos de la separación maternal temprana sobre el desempeño en el laberinto en ratas adultas. *Acta biológica colombiana.* 17 (1), 129-142.

**Esterbauer H**, Cheeseman K (1990) Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol.* 186:407–421.

**Euser A**, Finken M, Kiejzer-Veen M, Hille E, Wit J, Dekker F (2005) Associations between prenatal and infancy weight gain and BMI, fat mass, and fat distribution in young adulthood: a prospective cohort study in males and females born very preterm. *Am J Clin Nutr.* 81: 480-7.

- Fabrice Duval MD, Félix González MD, Hassen Rabia MD (2010)** Neurobiología del estrés. *Rev chil neuro-psiquiatr.* 48: 307-318.
- Fernandez Martinez E (2009)** Estrés percibido, estrategias de afrontamiento y sentido de coherencia en estudiantes de enfermería: su asociación con salud psicológica y estabilidad emocional. Tesis Doctoral. Universidad de Leon. España. Departamento de Psicología Sociología y Filosofía.
- Fernández-Castro J, Coll Andreu M (2011)** Effects of stress due to immobilization on responses learned in rats: Changes in indicated avoidance responses. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta.* 1987, Vol. 13, Núms.1 y 2, págs. 145-152
- Fernandez-Twinn D, Ozanne S (2006)** Mechanisms by which poor early growth programs type-2 diabetes, obesity and the metabolic síndrome. *Physiol Behav.* 88:234-243
- Ferreira A (1965)** Emotional factors in prenatal environment. *J Nerv Ment DIS.* 141:108-118.
- Ferry A, Picard F, Duvallet A, Weill B, Rien M (1990)** Changes in blood leukocyte populations induced by acute maximal and chronic submaximal exercise. *Eur J Appl Physiol.* 59:435-442
- Ferry A, Weill B, Amirides I, Lazary F, Rien M (1991)** Splenic Immunomodulations Induce Stress in Rats. *Letters of Immunology* 29: 261-264.
- Fitzgerald L (1991)** Overtraining Increases Susceptibility to Infection. *Int J Sports Med.* 12: 5-8.
- Fogarty M, Hughes C, Burke G, Brown J, Trinick T (2011)** Exercise-induced lipid peroxidation: Implications for deoxyribonucleic acid damage and systemic free radical generation. *Environ Mol Mutagen* 52: 35–42.
- Fraga C, Shigenaga M, Park J, Degan P, Ames B (1990)** Oxidative damage to DNA during aging: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in the DNA and urine of rat organs. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4533-4537.
- Galigniana MD, Radanyi C, Renoir JM, Housley PR, Pratt WB (2001)** Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus. *J Biol Chem.* 276:14884–14889.
- Ganong WF (2010)** Fisiología Médica 23ra Edición. Editorial McGraw-Hil.
- García C, Lagunas N, Calmarza Font I, Azcoitia I, Chaves Y, Garcia Segura L, Baquedano E, Frago L, Argente J, Chowen J (2010)** Diferencias de género en los

efectos a largo plazo del estrés prenatal crónico en el eje hipotalámico hipofiso adrenal y la estructura hipotalámica en ratas. *Rev. Fisioneuroendocrinología* 35: 525-1535.

**Giera M**, Lingeman H, Niessen M (2012) Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. *Chromatographia* 75:433–440.

**Gil E (2007)** Discriminación de los efectos de la fluoxetina y la cocaína sobre la ejecución en el test de nado forzado en ratas cepas Wistar. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de ciencias biológicas. Bogotá Colombia.

**Glover V (2011)** Annual Research Review: Prenatal stress and the origins of psychopathology: an evolutionary perspective. *J Child Psychol Psychiatry*. 52:356-67.

**Glyn J (1998)** The discovery and early use of cortisona. *J R Soc Med*. 91:513-517.

**Gómez C**, Saldivar-González JA, Rodríguez R (2002) Modelos animales para el estudio de la ansiedad: Una aproximación crítica. *Salud Mental* 25:14-24.

**Gomez-Cabrera M**, Borrás C, Pallardo F, Sastre J, Ji L, Vina J (2005) Decreasing xanthine oxidase-mediated oxidative stress prevents useful cellular adaptations to exercise in rats, *J. Physiol*. 567. 113–120.

**Gomez-Cabrera M**, Domenech E, Vina J (2008) Moderate exercise is an antioxidant: up regulation of antioxidant genes by training, *Free Radic. Biol. Med*. 44. 126–131.

**Gomez Cabrera M**, Vina J, Ji LL (2009) Interplay of oxidants and antioxidants during exercise: implications for muscle health. *Phys Sportsmed* 37: 116–123.

**Gómez González B**, Escobar A (2002) Neuroanatomy of stress. *Mex J Neurosci*. 3:273-282.

**Gonzales D (2014)** Determinación de niveles de corticosterona plasmática y pilosa en ratas Wistar adolescentes hacinadas. Universidad Nacional de Colombia Facultad de Medicina Bogotá D.C., Colombia.

**Götz A**, Stefanski V (2007) Psychosocial maternal stress during pregnancy affects serum corticosterone, blood immune parameters and anxiety behaviour in adult male rat offspring. *Physiol Behav*. 90:108–115.

**Grinna L (1977)** Age-related changes in the lipids of the microsomal and mitochondrial membranes in liver and kidney of rats. *Mech Age Dev*. 6: 197-205.

**Groves P**, Thompson R (1970) Habituation: A Dual-process Theory. *Psychological Review* 77:419-450.

**Grupo de Estudio 757 (2014)**. Apuntes de la diplomatura en entrenamiento de la fuerza. Universidad Nacional del Litoral.

**Guezennec CY**, Oliver C, Lienhard F, Seyfried D, Huet F, Pesce G (1992) Hormonal and metabolic response to a pistol-shooting competition. *Sci Sports*. 7:27-32

**Gul M**, Laaksonen DE, Atalay M, Vider L, Hanninen O (2002) Effects of endurance training on tissue glutathione homeostasis and lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rats. *Scand J Med Sci Sports* 12: 163–170.

**Guyton A**, Hall J Tratado de fisiología médica. 13ª Ed. ISBN: 9788491130246. Editorial:Elsevier España. Año de Edición: 2016. Paginas:1168.

**Halliwell B**, Gutteridge J, Radicales libres en biología y medicina. 5ta Edición. Prensa de la Universidad de Oxford. Año de Edición: 2015. ISBN: 97801-98717-47-8.

**Halliwell B (1999)** Establishing the significance and optimal intake of dietary antioxidants: the biomarker concept, *Nutr. Rev.* 57. 104–113.

**Harman D (1972)** The biological clock: the mitochondria. *J Am Geriatr Soc.* 20: 145-7.

**Hecksteden A**, Kraushaar J, Rosenberger F (2015) Respuesta individual al entrenamiento: una perspectiva estadística. *Sociedad Americana de fisiología. Revista de fisiología aplicada.* Vol. 118. Nº 12. pp: 1450 – 1459.

**Herman J**, Prewitt C, Cullinan W (1996) Neuronal circuit regulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical stress axis. *Crit Rev Neurobiol* 10:371-394.

**Herrero A**, Barja G (2001) Effect of aging on mitochondrial and nuclear DNA oxidative damage in the heart and brain throughout the life span of the rat. *J Am Aging Assoc* 45-50.

**Hoene M**, Weigert C (2010) The stress response of the liver to physical exercise. *Exerc Immunol Rev* 16: 163–183.

**Hoene M**, Franken H, Fritsche L, Lehmann R, Pohl AK (2010) Activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signalling pathway in the liver of mice is related to plasma glucose levels after acute exercise. *Diabetologia* 53: 1131–1141.

**Huang C**, Tsai SC, Lin WT (2008) Potential ergogenic effects of L-arginine against oxidative and inflammatory stress induced by acute exercise in aging rats. *Exp Gerontol* 43: 571–577.

**Huck G (2014)** Physiological and immune responses in stressed prenatally adult rats, exposed to acute stress by forced swimming.

**Jackson M (2000)** Exercise and production of radical oxygen by muscle. *Manual of Oxidants and Antioxidants in Exercise* 57-68.

**Jenkins R (1988)** Free radical chemistry. Relationship to exercise. *Sports Med.* 1988; 5:156e170.

- Ji L (1993)** Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med Sci Sports Exerc.* 25: 225-31.
- Ji L, Fu R (1992)** Responses of glutathione system and antioxidant enzymes to exhaustive exercise and hydroperoxide. *J Appl Physiol.* 72: 549-54.
- Ji L, Leeuwenburgh C (1996)** Glutathione and exercise. *Pharmacology in exercise and sports* 96-123.
- Ji L (2008)**, Modulation of skeletal muscle antioxidant defense by exercise: role of redox signaling, *Free Radic. Biol. Med.* 44. 142–152.
- Jones BJ, Costall B, Domeney AM, Kelly ME, Naylor RJ, Oakley NR, Tyers MB (1988)**
- Jones D (2008)** Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295:849-868.
- Kajantie E (2006)** Fetal Origins of Stress-Related Adult Disease. *Ann N Y Acad Sci.* 1083:11-27.
- Kakarla P, Vadluri G, Reddy Kesireddy S (2005)** Response of hepatic antioxidant system to exercise training in aging female rat. *J Exp Zool A Comp Exp Biol* 303: 203–208.
- Kant GJ, Bunnell BN, Mougey EH, Pennington LL, Meyerhoff JL (1983)** Effects of repeated stress on pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, corticosterone and growth hormone in male rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 18:967-971.
- Kanter M (1998)** Free radicals, exercise and antioxidant supplementation. *Proc Nutr Soc.* 57:9-13.
- Kapoor A, Matthews SG (2008)** Prenatal stress modifies behavior and hypothalamic–pituitary–adrenal function in female guinea pig offspring: effects of timing of prenatal stress and stage of reproductive cycle. *Endocrinology* 149:6406–6415.
- Karrow NA (2006) Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and autonomic nervous system during inflammation and altered programming of the neuroendocrine-immune axis during fetal and neonatal development: Lessons learned from the model inflammagen, lipopolysaccharide. *Brain Behav Immun* 20: 144-158.
- Karst H, Berger S, Erdmann G, Schütz G, Joëls M (2010)** Metaplasticity of amygdalar responses to the stress hormone corticosterone. *Proc Natl Acad Sci* 07:14449–54.
- Korivi M, Hou C, Huang C, Lee S, Hsu M (2012)** Ginsenoside- Rg1 Protects the Liver against Exhaustive Exercise-Induced Oxidative Stress in Rats. *Evid Based Complement Alternat Med* doi:10.1155/2012/932165; 2012.
- Katch V, William D, Katch F.** *Fisiologia del ejercicio. Fundamentos.* 4ta Edicion. Editorial Panamericana. Año de edicion: 2017. ISBN: 9788498354805. Paginas: 702.

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

**Krey LC, Lu KH, Butler WR, Hotchkiss J, Piva F, Knobil E (1975)** Surgical Disconnection of the Medial Basal Hypothalamus and Pituitary Function in the Rhesus Monkey. II. GH and Cortisol Secretion. *Endocrinol.* 96:1088–1093,

**La Fleur S, Akana S, Manalo S, Dallman M (2004)** Interaction between corticosterone and insulin in obesity: regulation of lard intake and fat stores. *Endocrinology* 145: 2174–2185.

**Lee C, Okabe E (1995)** Hydroxyl radical-mediated reduction of Ca(2+) ATPase activity of masseter muscle sarcoplasmic reticulum. *Jpn J Pharmacol* 67: 21-8.

**Lee HK, Park KS, Cho YM, Lee YY, Pak YK (2005)** Mitochondria based model for fetal origin of adult diseases and insulin resistance. *Ann NY Acad Sci.* 1042: 1-18.

**Lee J, Goldfarb A (2002)** Eccentric exercise effect on blood oxidative-stress markers and delayed onset of muscle soreness. *Med Sci Sports Exerc.* 34: 443-8.

**Leeuwenburgh C, Ji LL (1995)** Glutathione depletion in rested and exercised mice: biochemical consequence and adaptation. *Arch Biochem Biophys* 316: 941–949.

**Leeuwenburgh C, Heinecke J (2001)** Oxidative stress and antioxidants in exercise. *Curr Med Chem* 8:829-38.

**Lemaire V, Taylor GT, Morméde P (1997)** Does adrenal axis activation by social stress inhibit testicular axis?. *Psychoneuroendocrinol.* 22:563-573

**León A, Gutiérrez G, De la Rosa E, Cedillo C (2010)** Prevalence of maternal sadness and its associated factors. *Ginecol Obstet Mex* 78:53-57.

**Levy EA, Govic A, Hazi A, Flannery G, Christianson J, Drugan RS, Stephen Kent S (2006)** Endocrine and immunological correlates of behaviorally identified swim stress resilient and vulnerable rats. *Brain Behav Immun* 20: 488–497.

**Li L, Davie J (2010)** The role of Sp1 and Sp3 in normal and cancer cell biology. *Ann Anat.* 192:275–283.

**Liaudat A, Rodríguez N, Chen S, Romanini M, Vivas A, Gauna H, Mayer N (2014)** Adrenal response of male rats exposed to prenatal stress and early postnatal stimulation. *Biotech Histochem.* 10

**Ligi I, Simoncini S, Tellier E (2011)** A switch toward angiostatic gene expression impairs the angiogenic properties of endothelial progenitor cells in low birth weight preterm infants. *Blood.* 118:1699-1709.

**Lima F, Stamm D, Della-Pace I, Dobrachinski F, Carvalho N, Royes F, Soares F, Rocha J, Gonzalez-Gallego J, Bresciani G (2013)** Swimming training induces liver

mitochondrial adaptations to oxidative stress in rats submitted to repeated exhaustive swimming bouts. PLoS ONE 8(2): e55668. doi:10.1371/journal.pone.0055668.

**Linares H, Morales S (2012)** Impacto de la psicoprofilaxis obstetrica en la reduccion de la morbilidad y mortalidad maternal y perinatal.

**Lipinski B, Pretorius E (2012)** Hydroxyl radical-modified fibrinogen as a marker of thrombosis: the role of iron. Hematology 17:241–247.

**Liu D, Diorio J, Tannenbaum B, Caldji C, Francis D, et al. (1997)** Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. Science 277:1659-1662.

**Llusiá J, Tresguerres F (1996)** Hormones, Instincts and Emotions. Editorial Complutense.

**López Chicharro JL, Vaquero L.** Metabolismo y utilización de sustratos en el ejercicio. Fisiología del ejercicio. Editorial Médica Panamericana. Año de Edición: 2008. ISBN: 978-950-06-8247-3. Páginas: 1005.

**López Chicharro J, Vicente Campos D, Cancino J.** Fisiología del entrenamiento aeróbico: una visión integrada. Editorial Panamericana. Año de edición: 2013 ISBN: 978-84-9835-720-2. Páginas: 128.

**López Chicharro J, Vicente Campos D.** Umbral láctico: bases fisiológicas y aplicación al entrenamiento. Bases fisiológicas y aplicación al entrenamiento. Editorial: Panamericana. Año de edición: 2017. ISBN: 978-84-9835-180-4. Páginas: 114.

**López Chicharro J, Fernández Vaquero A.** Bioenergética de las fibras musculares y del ejercicio. Editorial: Autor Edición. Año de Edición: 2017. ISBN: 978-84-697-6764-1. Páginas: 128.

**Lopez M (2005)** Apophonies Resilience before epigenetic crises.

**Lopez M, Ilia G (2004)** Stress. Part I: Vulnerability (one side of the coin). Psychoneuroimmunoendocrinology New Dilemmas for Old Paradigms. Old Dilemmas for Neoparadigmas. Editorial Polemos.

**Lundberg U (2005)** Stress hormones in health and illness: the roles of work and gender. Psychoneuroendocrinology 30: 1017–1021.

**Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, Xiong X, Walker M (2006)** Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress?. Med Hypotheses 66:38- 44.

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

**Mackinnon LT (2000)** Chronic Effects by Training in Immune Function. *Int J Sports Phys Ther.* 32: 369-376.

**Magee S**, Bublitz MH, Orazine C, Brush B, Salisbury A, Niaura R, Stroud L **(2014)** The relationship between Maternal–Fetal attachment and cigarette smoking over pregnancy. *Matern Child Health J.* 18:1017-1022.

**Majewska MD (1992)** Neuroactive steroids: Endogenous bimodal modulators of the GABAA receptor. Mechanism of action and physiological significance. *Prog Neurobiol.* 38:379

**Malaguti M**, Angeloni C, Garatachea N, Baldini M, Leoncini E **(2009)** Sulforaphane treatment protects skeletal muscle against damage induced by exhaustive exercise in rats. *J Appl Physiol* 107: 1028–1036.

**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.

**Marliss E**, Kreisman S, Manzon A, Halter J, Vranic M, Nessim S **(2000)** Gender Differences in the Regulation of Glucose before Intense Exercise. *J Appl Physiol.* 8:457-466.

**Martí O**, Martí J, Armario A **(1994)** Effects of chronic stress on food intake in rats: influence of stressor intensity and duration of daily exposure. *Physiol Behav.* 55: 747–753.

**Martinez-Morgan M**, Martinez S **(2017)** Neuroplasticidad: sinaptogénesis durante el desarrollo normal y su implicación en la discapacidad intelectual. *Rev Neurol.* 64: 45-50.

**Mastorakos G**, Pavlatou M **(2005)** Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus–pituitary–adrenal and the hypothalamus–pituitary–thyroid axes. *Horm Metab Res* 37: 577–584.

**Mathers J (2007)** Early nutrition: impact on epigenetics. *Forum Nutr.* 60:42-48.

**Mayer E**, Rifas S, Zhou L, Hu F, Colditz G, Gillman M **(2006)** Breast-feeding and risk for childhood obesity. Does maternal diabetes or obesity status matter? *Diabetes Care.* 29: 2231-2237.

**Mayer N**, Greco C, Bertuzzi M, Rodriguez N, Vivas A, Gauna H **(2010)**. Immobilization stress responses in adult rats exposed in utero to immobilization. *Stress and Health* 27: 1-10.

**McCord J. (1979)** Superoxide, superoxide dismutase and oxygen toxicity. *Rev Biochem Toxicol.*10:109e121.

- Mc Ewen B (2000)** Cortisol, Cushing's syndrome and an increasingly reduced brain: new evidence of reversibility. *Clin J Endocr Metab.* 87: 1947-1948.
- Medina J, Melica A, Lorenzati J, Perez G (2017)** Estudio de un protocolo para determinar autoxidación en lípidos de productos de pescado de río. *Nexo revista científica.* ISSN-E 1995-9516 Vol. 29. N° 1. pp 14-21.
- Meister A (1983)** Selective modification of glutathione metabolism. *Science* 220: 472-477.
- Merlo D, Sormani M, Bruzzi P (2006)** Molecular epidemiology: new rules for new tools? *Mutat. Res.* 600. 3–11.
- Michael J, Duryee M, Lynell W, Klassen M, Courtney S, Schaffert D, Dean J, Tuma P, Carlos D, Hunter B, Robert P, Garvin B, Anderson M, Geoffrey M (2010)** Malondialdehyde / acetaldehyde adduct (MAA) is the dominant epitope after MDA modification of proteins in atherosclerosis. *Free Radic Biol* 49: 1480–1486.
- Michajlovskij N, Lichardus B, Kvetňasnsky R, Ponec J (1988)** Effect of acute and repeated immobilization stress on food and water intake urine output and vasopressine changes in rats. *Endocrinol Exp.* 22: 143-157
- Morralla A, Urrutiab G, Bonfillb X (2017)** Placebo effect and therapeutic context: a challenge in clinical research. *Med Clin.* 149: 26-31.
- Moscoso M (2009)** De la mente a la célula: impacto del estrés en psiconeuroinmunoendocrinología. liber. v.15 n.2 Lima jul./dic. 2009. Scielo Perú.
- Moscoso M (2010)** El estrés crónico y la terapia neurocognitiva: una nueva dimensión en psiconeuroinmunología. *Persona* 13. ISSN: 1560-6139. Pp 11-29
- Moya Albiol L, Salvador A (2001)** Efectos del ejercicio físico agudo sobre la respuesta psicofisiológica al estrés: papel modulador de la condición física. *Revista de psicología del deporte.* Vol: 10. Pp 35-48.
- Muller D, Judd C, Yzerbyt V (2005)** When moderation is mediated and mediation is moderated. *J Pers Soc Psychol.* 89:852-863.
- Murakami T, Shimomura Y, Yoshimura A, Sokabe M, Fujitsuka N (1998)** Induction of nuclear respiratory factor-1 expression by an acute bout of exercise in rat muscle. *Biochim Biophys Acta.* 1381:113-22.
- Nepomnaschy PA, Welch K, McConnell D, Low B, Strassmann B, England BG (2006).** Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103: 3938-3942.
- Newton R (2000)** Molecular mechanism of glucocorticoid action: what is important?. *Thorax.* 55: 603-613.

**Nikolaidis M**, Kyparos A, Vrabas I, (2011) Isoprostane formation, measurement and interpretation: the role of exercise, *Prog. Lipid Res.* 50. 89–103.

**Nikolaidis M**, Kyparos A, Spanou C, Paschalis V, Theodorou A, Panayiotou G, Grivas G, Zafeiridis A, Dipla K, Vrabas I (2013) Aging is not a barrier to muscle and redox adaptations: applying the repeated eccentric exercise model, *Exp. Gerontol.* 48. 734–743.

**Oberlander TF**, Bonaguro RJ, Misri S, Papsdorf M, Ross CJ, Simpson EM (2008) Infant serotonin transporter (SLC6A4) promoter genotype is associated with adverse neonatal outcomes after prenatal exposure to serotonin reuptake inhibitor medications. *Mol Psychiatry* 13:65-73.

**Odio M**, Brodish A (1989) Age-related adaptation of pituitary-adrenocortical responses to stress. *Neuroendocrinology* 49: 382:388.

**Ojeda NB**, Grigore D, Alexander BT (2008) Intrauterine growth restriction: fetal programming of hypertension and kidney disease. *Adv Chronic Kidney Dis.* 15:101-106

**Oken E**, Gillman M (2003) Fetal origins of obesity. *Obes Res.* 11:496-506.

**Osorio E**, Huertas L, Aviles S, Coboss R, Zamudio G (2008) Depresión, ansiedad y desesperanza aprendida en pacientes con artritis reumatoide. *Psicología y salud.* Vol 18, No 1. ISSN impreso: 1405-1109.

**Paulsen G**, Cumming K, Holden G, Hallen J, Ronnestad B, Sveen O, Skaug A, Paur I, Bastani N, Ostgaard H, Buer C, Midttun M, Freuchen F, Wiig H, Ulseth E, Garthe I, Blomhoff R, Benestad H, Raastad T (2014) Vitamin C and E supplementation hampers cellular adaptation to endurance training in humans: a double-blind, randomised, controlled trial, *J. Physiol.* 592 (2014) 1887–1901.

**Patel M**, Srinivasan M (2011) Metabolic programming in the immediate postnatal life. *Ann Nutr Metab.* 58:18–28.

**Pedersen BK**, Hoffman-Goetz L (2000) Exercise and the immune system: regulation, integration, and adaptation. *Physiol Rev.* 80:1055-1081.

**Pedersen BK**, Ullum H (1992) Exercise and immunity-Mechanisms of action. *Med Sports Sci.* 26:140-146.

**Pelaia G**, Vatrella A, Cuda G, Maselli R, Marsico S (2003). Molecular mechanisms of corticosteroid actions in chronic inflammatory airway diseases. *Life Sci.* 72:1549-61.

**Piedrafita-Trigo E** (2013) Efectos del ejercicio físico en la fluidez de membranas celulares y mitocondriales: su relación con el estrés oxidativo. Departamento de Farmacología. Universidad de Zaragoza. Repositorio de la Universidad de Zaragoza-Zaguan. <http://zaguan.unizar.es>

- Pizzimenti S**, Ciamporcero E, Daga M (2013) Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Front Physiol.* 4:242.
- Poltyrev T**, Keshet GI, Kay G, Weinstock M (1996) Role of experimental conditions in determining differences in exploratory behavior of prenatally stressed rats. *Dev Psychobiol.* 29:453-62.
- Porsolt RD**, Anton G, Blavet N, Jalfre M (1978) Behavioural despair in rats: a new model sensitive to antidepressant treatments. *Eur J Pharmacol.* 47:379-391.
- Porsolt RD**, Bertin A, Jalfre M (1977) Behavioural despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Arch int Pharmacodyn Ther.* 229:327–336.
- Powers S**, Duarte J, Kavazis A, Talbert, E (2010) Reactive oxygen species are signalling molecules for muscle adaptation. *Exp Physiol* 95: 1–9.
- Pujols L**, (2015) Mecanismos de resistencia a los glucocorticoides en enfermedades respiratorias. *Medicina respiratoria* 8 (3):31-42.
- Quintanar-Escorza M**, Calderón-Salinas J (2009) The total antioxidant capacity. Bases and applications. *Rev Edu Bioquímica* 28:89-101.
- Rabasa C**, Delgado-Morales R, Muñoz-Abellán C, Nadal R, Armario A (2011) Adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and glucose to repeated immobilization or restraint stress is not influenced by associative signals. *Behav Brain Res.* 217:232-239.
- Radak Z**, Chung H, Goto S (2008) Systemic adaptation to oxidative challenge induced by regular exercise. *Free Radic Biol Med.* 44:153-9.
- Radak Z**, Sasvari M, Nyakas C, Taylor AW, Ohno H (2000) Regular training modulates the accumulation of reactive carbonyl derivatives in mitochondrial and cytosolic fractions of rat skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 383: 114–118.
- Ramirez I**, Ballesteros A, Sedano L, Barrios M (2016) Supresion del eje hipotalamo-hipofiso-suprrenal despues de la quimioterapia de induccion en niños con leukemia linfoide aguda. *Latrea Vol, 29, numero 1.* pp 18-26. Universidad de Antioquia Medellin, Colombia.
- Ramírez R**, Echeverry I, Ortega J, Mosquera M, Salazar B, Girón S (2011) A factorial randomized controlled trial to evaluate the effect of micronutrients supplementation and regular aerobic exercise on maternal endothelium-dependent vasodilatation and oxidative stress of the newborn. *Trials.* 12:60
- Robertson A**, Ramerar C, Potts J, Gibbs M (1981) The effect of strenuous physical exercise on circulating blood lymphocytes and serum cortisol levels. *J Clin Immunol.* 5: 53.

**Rodríguez N, Mayer N, Gauna H (2007).** Effects of prenatal stress on male offspring sexual maturity. *Biocell*. 31: 67-74.

**Rosen D, Kelch RP (1995)** Pubertad precoz y retrasada. Principios y práctica de endocrinología y metabolismo. 830-842.

**Ross M, Beall M (2008)** Adult sequelae of intrauterine growth restriction *Semin Perinatol*. 32:213-218.

**Ross R (1993)** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Naturaleza*. 362: 801-809.

**Rossmann M, Groot J, Rees V, Zhao J, Amann M, Richardson R (2013)** Estrés oxidativo y EPOC: el efecto de los antioxidantes orales sobre la fatiga muscular esquelética. *Medicina y ciencia en deportes y ejercicio*. 45 (7): 1235-1243.

**Santos J, Perdue MH (2000).** Stress and Neuroimmune Regulation. *Gut*. 47:94-151.

**Sapolsky RM (2004)** Why zebras don't get ulcers.

**Schneider C, Barp J, Ribeiro J, Belló-Klein A, Oliveira R (2005)** Oxidative stress after three different intensities of running. *Can. J. Appl. Physiol*. 30(6): 723- 734. © 2005 Canadian Society for Exercise Physiology.

**Seckl JR (2008)** Glucocorticoids, developmental "programming" and the risk of affective dysfunction. *Prog Brain Res*.167:17-34.

**Seckl JR, Holmes MC (2007)** Mechanisms of disease: glucocorticoids, their placental metabolism and fetal 'programming' of adult pathophysiology. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 3:479-88.

**Seligman M (1975)** Helplessness. On depression, development, and death.

**Seligman M (1978)** Comment and integration. *J Abnorm Psychol*. 87: 165-179.

**Selye H (1950)** Stress and General Adaptation Syndrome. *Br J Med*. 1:1383-1392.

Send to

**Sharp N, Koutedakis Y (1992)** Sport and the overtraining syndrom: immunological aspects. *British Med Bull*. 48:518-533.

**Sies H (1985)** Oxidative Stress. Academic Press.

**Simmons R (2007)** Role of metabolic programming in the pathogenesis of  $\beta$ -cell failure in postnatal life. *Rev Endocr Metab Disord*. 8: 95-104.

**Smith J, Telford R, Mason I, Weidenann M (1990)** Exercise, training and neutrophil microbicidal activity. *Int J Sports Med*. 11: 179-187.

**Stepanian A (2016)** Síntomas, niveles de estrés y estrategias de afrontamiento en una muestra de estudiantes masculinos y femeninos de una institución de educación

superior militar: análisis comparativo. Tesis de maestría. Universidad catolica de Colombia. Facultad de Psicología. Maestria en Psicología.

**Suarez F (2014)** Módulo de entrenamiento de las capacidades físicas. <http://agrega.educacion.es>

**Talge N, Charles N, Vivette G (2007)** Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why?. *J Child Psychol Psychiatry.* 48: 245-261.

**Taylor D, Thompson C, Kemp G (1995)** A relationship between impaired fetal growth and reduced muscle glycolysis revealed by <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy. *Diabetologia* 38: 1205-1212.

The potential anxiolytic activity of GR 38032F a 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist. *Br J Pharmac.* 93:985-993.

**Theodorus A, Paschalis V, Kyparos A, Panayiotou G, Nikolaidis M (2014)** El tabaquismo pasivo se reduce y la vitamina C aumenta el estrés oxidativo inducido por el ejercicio: ¿esto hace que fumar pasivamente sea un antioxidante y que la vitamina C sea un estímulo prooxidante?. Elsevier. Vol. 454. pp 131-136.

**Thirumalai T, Viviyan T, Elumalai E, David E (2011)** Intense and exhaustive exercise induce oxidative stress in skeletal muscle. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease.* 63-66.

**Thompson P, Crouse S, Goodpaster B, Kelley D, Moyna N, Pescatello L (2001)** The acute versus chronic response to exercise. *Med Sci Sports Exerc.* 33:438-445.

**Towle A, Sze P (1983)** Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J Steroid Biochem.* 18:135-143

**Tozzi-Ciancarelli MG, Penco M, Di Massimo C (2002)** Influence of acute exercise on human platelet responsiveness: possible involvement of exercise-induced oxidative stress. *Eur J Appl Physiol.* 86: 266-272.

**Treuth M, Hunter G, Williams M (1996)** Effects of exercise intensity on 24h energy expenditure and substrate oxidation. *Med Sci Sports Med.* 28:1138–43.

**Tuma D (2002)** Role of malondialdehyde-acetaldehyde adducts in liver injury. *Free Radic Biol Med.* 32:303–308.

**Turcotte L, Richter E, Keins B (1992)** Increased plasma FFA uptake and oxidation during prolonged exercise in trained vs untrained humans. *Am J Physiol.* 262:791-799.

**Ulrich Lai Y, Arnhold M, Engeland C (2006)** La inervación esplénica suprarrenal de quinina contribuye al ritmo diurno del plasmama corticosterona en ratas mediante la modulación de la sensibilidad suprarrenal a ACTH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Vol 290. R1128-1135.

- Umland S**, Schleimer R, Johnston S (2002) Review of the molecular and cellular mechanisms of action of glucocorticoids for use in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 15:35-50.
- Velez M**, Salazar A, Uribe L (2012) Actividad de cortisol en plasma en ratas bajo condiciones de estrés crónico complementado con resveratrol. *Colombia medica.* Vol. 43. colombiamedica.univalle.edu.co
- Vallée M**, Maccari S, Dellu F, Simon H, Le Moal M, Mayo W (1999) Long-term effects of prenatal stress and postnatal handling on age-related glucocorticoid secretion and cognitive performance: a longitudinal study in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 11: 2906–2916.
- Venero J**, Revuelta M, Atiki L (2003) Evidence for dopamine-derived hydroxyl radical formation in the nigrostriatal system in response to axotomy. *Free Radic Biol Med.* 34:111–123.
- Veneroso C**, Tunon MJ, Gonzalez-Gallego J, Collado PS (2009) Melatonin reduces cardiac inflammatory injury induced by acute exercise. *J. Pin. Res.* 47: 184–191.
- Veneroso C** (2010) Effect of acute exercise on Toll-4 receptor expression and inflammatory mechanisms in rat heart. *Rev Méd Chile.* 140:1282-1288.
- Vieau D**, World J (2011) Perinatal nutritional programming of health and metabolic adult disease. *Diabetes* 2:133-136.
- Vigas M** (1980) Contribution to the understanding of the stress concept in catecholamines and stress: recent advance. 573-578.
- Villa J**, Almar M, Collado P, Llamazares E, Gonzalez-Gallego J (1993) Impairment of bile secretion induced by exhaustive exercise in the rat. Protective effects of S-adenosyl-L-methionine. *Int J Sports Med* 14: 179–184.
- Vinaccia S**, Cadena J, Juárez F, Contreras F, Anaya J (2004) Relaciones entre variables sociodemográficas, incapacidad funcional, dolor y desesperanza aprendida en pacientes con diagnóstico de artritis reumatoide *International Journal of Clinical and Health Psychology*, vol. 4, núm. 1, enero, pp 91-103
- Vineis P**, Perera F (2007) Molecular epidemiology and biomarkers in etiologic cancer research: the new in light of the old, *Cancer Epidemiol. Biomark. Prev.* 16 (2007) 1954–1965.)
- Waddington C** (1942) The Epigenotype. *Endeavour.* 1:18-20.
- Walsh NP**, Gleeson M, Shephard RJ, Gleeson M, Woods JA, Bishop NC, Fleshner M, Green C, Pedersen BK, Hoffman-Goetz L, Rogers CJ, Northoff H, Abbasi A, Simon P (2011) Immune function and exercise. *Exer Immunol Rev.* 17: 6-63.

**Wang G, Li H, Firoze M (2012)** Differential oxidative modification of proteins in MRL+/+ and MRL/lpr mice: increased formation of lipid peroxidation-derived aldehyde-protein adducts may contribute to accelerated onset of autoimmune response. *Free Radic Res.* 46:1472– 1481.

**Weinstock M (2001)** Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behaviour of the offspring. *Prog Neurobiol.* 65:427- 451.

**Weinstock M (2008)** The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neurosci Biobehav Rev.* 32: 1073–1086.

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

**Whincup P, Kaye SJ, Owen CG, Huxley R, Cook DG, Anazawa S, Barrett-Connor E, Bhargava SK, Birgisdottir BE, Carlsson S, y col. (2008)** Birth weight and risk of type 2 diabetes: a systematic review. *J Am Med Assoc.* 300:2886-2897.

**Whitaker R (2004)** Predicting preschooler obesity at birth: the role of maternal obesity in early pregnancy. *Pediatrics.* 114:1.

**Willmore J, Kenney W, Costill D.** *Fisiología del deporte y el ejercicio.* 5ta Edición. Editorial Panamericana. Año de Edición: 2017. ISBN: 9780736087728. Páginas: 575.

Wilson D, Johnson P (2000) Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. *J Appl Physiol* 88: 1791–1796.

**Woodman D (1997)** The adrenal glands. *Laboratory animal endocrinology* 253-286.

**Wu Z, Puigserver P, Andersson U, Zhang C, Adelmant G, Mootha V, Troy A, Cinti S, Lowell B, Scarpulla R, Spiegelman B (1999)** Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC. *Cell.* 98:115-24.

**Young T, Martens P, Taback P, Saller E, Dean H, Cheang M (2002)** Type 2 diabetes mellitus in children prenatal and early infancy risk factors among native Canadians. *Arch Pediatr Adolesc Med.* 156: 651-655.

**Zulet M, Puchau B, Navarro C, Martí A, Martínez J (2007)** Biomarcadores del estado inflamatorio: nexos de unión con la obesidad y complicaciones asociadas. *Nut Hosp.* 22:511-27.