

Efecto del estrés crónico sobre la inmunolocalización del factor de crecimiento del endotelio vascular en la corteza adrenal de ratas gestantes

Effect of chronic stress on the immunolocalization of vascular endothelial growth factor in the adrenal cortex of pregnant rats

FLORES BRACAMONTE, MC¹; COTS, D¹; BELLINGERI, R²; BOZZO, A²

¹Instituto de Ciencias Veterinarias (INCIVET) CONICET, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, Córdoba, 5800, Argentina. ²Instituto de Investigaciones en Tecnologías Energéticas y Materiales Avanzados (IITEMA) CONICET, Universidad Nacional de Río Cuarto, Ruta 36 Km 601, Río Cuarto, Córdoba, 5800, Argentina.

RESUMEN

El estrés crónico durante la gestación puede alterar la morfología de la corteza adrenal y su vasculatura. El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) interviene en la vascularización y en la angiogénesis. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del estrés crónico materno sobre los niveles plasmáticos de corticosterona y sobre la distribución de la inmunomarcación de VEGF en la corteza adrenal de ratas gestantes. El estrés por inmovilización fue aplicado desde el cuarto día de la gestación hasta el sacrificio a los 12, 17 y 21 días de la gestación. Se emplearon técnicas de radioinmunoanálisis, inmunomarcación y recuentos celulares. En las ratas estresadas gestantes se observó un incremento significativo ($p < 0,05$) en los niveles plasmáticos de corticosterona en todos los momentos estudiados. La inmunolocalización evidenció, en la corteza adrenal, marcación para VEGF en la zona fascicular y en la zona semejante a reticular, pero no en la zona glomerular. Se identificó una disminución significativa de la marcación con VEGF a los 17 días de gestación en el grupo estrés ($p < 0,05$). Estos resultados demuestran que la inmovilización es un estímulo estresor intenso y que los glucocorticoides producidos podrían disminuir la síntesis de VEGF.

Palabras clave: (corticosterona), (inmovilización), (gestación), (angiogénesis)

ABSTRACT

Chronic stress during pregnancy can alter the adrenal cortex morphology and its vasculature. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is involved in vascularization and angiogenesis. The objective of this study was to evaluate the effects of maternal chronic stress on plasma corticosterone levels and on the distribution of VEGF immunostaining in the adrenal cortex of pregnant rats. Immobilization stress was applied from the fourth day of gestation until sacrifice at 12, 17 and 21 days of gestation. Radioimmunoassay, immunolabeling and cell count techniques were used. In stressed pregnant rats, a significant increase ($p < 0.05$) in plasma corticosterone levels was observed at all gestation times analyzed. Immunolocalization revealed VEGF in the fascicular and in the reticular-like zone, but not in the glomerular zone of the adrenal cortex. A significant decrease in the VEGF labeling was identified at day 17 of gestation in the stressed group ($p < 0.05$). These results demonstrate that the immobilization is an intense stressor stimulus and that the glucocorticoids produced could decrease the VEGF synthesis.

Keywords: (corticosterone), (immobilization), (gestation), (angiogenesis)

INTRODUCCIÓN

El desarrollo vascular es un requisito fundamental para el crecimiento y funcionalidad de los tejidos y su homeostasis depende del equilibrio entre los procesos de apoptosis y proliferación celular²⁵. La glándula adrenal está constituida por una cápsula mesenquimatosa externa, debajo de la cual se encuentra la corteza y la médula. La corteza adrenal adulta está muy vascularizada, produce hormonas esteroideas y presenta tres zonas concéntricas³⁰: la zona glomerular (zG) que secreta mineralocorticoides cuya función principal es regular el volumen intravascular a través de la retención de sodio y, por lo tanto, controla la presión arterial; la zona fascicular (zF) que produce glucocorticoides (GC) que tienen diversos efectos sobre la inmunidad, el metabolismo, el desarrollo, el comportamiento y la respuesta a situaciones de estrés. Por último, la más interna, la zona reticular (zR) que sintetiza los andrógenos. Si bien las ratas y ratones carecen de una verdadera zR¹⁸, sobre la base de estudios recientes se ha evidenciado que, en estos roedores, la zF es heterogénea y contiene una subpoblación celular que puede compartir algunas similitudes con la zR, por lo que es denominada zona semejante a la reticular (zLR)^{11, 21}. La corteza adrenal está sometida a remodelaciones celulares que pueden ser explicadas por diferentes teorías. En la actualidad la teoría de la proliferación/migración

de las células progenitoras es la más aceptada y propone que todas las células de la corteza adrenal podrían tener un origen común que se vuelve funcionalmente diferenciado (zonificación histológica) con el apropiado entorno de la zona. Las células progenitoras proliferan en las capas periféricas de la glándula y posteriormente migran, efectuando una repoblación celular centrípeta²⁹.

La definición biológica de estrés refiere a un estado de homeostasis amenazada que es contrarrestado por un complejo repertorio de respuestas conductuales y fisiológicas para restablecerlo⁹. En general las situaciones de estrés son acompañadas por cambios de comportamiento, neuroquímicos, inmunológicos, endocrinos y metabólicos que tienen como objetivo fundamental asegurar la capacidad para desarrollar un comportamiento activo, al tiempo que inhiben los procesos anabólicos como la ingesta, el crecimiento y la reproducción^{3, 22}. La activación de estos cambios es coordinada por el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) con la secreción hipotalámica de la hormona liberadora de corticotrofina (CRH) y la consecuente liberación de la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) desde la hipófisis que induce la producción de GC en la corteza adrenal²². El incremento de los niveles plasmáticos de GC produce una retroalimentación negativa de la ACTH a nivel del hipotálamo y la adenohipofisis²⁰. De esta manera, la glándula

adrenal responde continuamente a estímulos repetidos y transitorios generados por el estrés que pueden afectar períodos como la gestación y desencadenar trastornos de ansiedad, depresión, déficits de atención y desbalances hormonales, muchos de los cuales están asociados con alteraciones del eje HHA. Por esta razón, varios modelos animales de estrés son utilizados en estudios de desórdenes psiquiátricos^{3,22}.

Cuando las condiciones estresantes son frecuentes o prolongadas, la corteza adrenal tiene la capacidad de adoptar una identidad funcional en respuesta a las señales del medio hormonal y el microambiente celular para mantener su homeostasis. Esto incluye procesos como la proliferación, la apoptosis y la expansión zonal y la diferenciación zonal²⁹.

Los efectos de las situaciones estresantes durante la gestación están en relación con la naturaleza del estímulo, su intensidad, duración de la exposición y los eventos que se producen en los compartimientos maternos y fetales⁵. Cuando se aplica un estrés crónico intermitente de intensidad suficiente como la inmovilización, la glándula adrenal responde con un aumento de su tamaño que se acompaña de un incremento máximo en los niveles plasmáticos de corticosterona (CORT) como respuesta al efecto trófico de la ACTH¹⁶. Originalmente, se consideró que la ACTH tenía un efecto antiproliferativo en la adrenal, aunque en los últimos años se ha descrito que podría tener un efecto inductor de la proliferación actuando por medio de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que es el principal factor que interviene en la vascularización de los tejidos. El VEGF participa en la inducción de la angiogénesis mediante la proliferación de las células endoteliales y el aumento de la permeabilidad vascular²⁵. Algunos autores observaron la presencia de VEGF en la corteza adrenal de ratas y evidenciaron que la ACTH estimula su síntesis y promueve la neovascularización adrenocortical^{24,27}. En cultivos de células bovinas la ACTH indujo un rápido aumento en la expresión de VEGF¹³. Sin embargo, el efecto de los GC sobre la expresión de VEGF en ratones es contradictorio. Resultados obtenidos en células pulmonares no evidenciaron variaciones en la expresión de VEGF², mientras que otros estudios realizados *in vitro* revelaron que la dexametasona inhibe la inducción de VEGF²³.

Estudios previos han demostrado que las características estereológicas de la glándula adrenal en ratas pueden verse afectadas por la exposición al estrés y por otras experiencias adversas que podrían alterar ciertos parámetros morfológicos y fisiológicos característicos de esta glándula²⁸. Sin embargo, existe poca información sobre la relación entre el estrés durante la gestación, la estructura y la vascularización adrenocortical. Debido a esto, el objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos del estrés crónico materno sobre los niveles plasmáticos de CORT y sobre la distribución de la inmunomarcación de VEGF en la corteza adrenal de ratas gestantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales y condiciones de laboratorio

Los animales utilizados fueron obtenidos del bioterio del Departamento de Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Río Cuarto (UNRC). Se utilizaron 30 ratas hembras albinas primíparas de la cepa Wistar, de 90 a 120 días de edad con un peso corporal inicial de 200 a 300 gramos. Fueron alojadas de a cuatro individuos por jaula en condiciones estándares de bioterio: temperatura de 22 ± 2 °C, fotoperiodo controlado con 12 horas de luz, humedad ambiente y con administración de alimento y agua "*ad-libitum*". Las instalaciones cumplen con los requisitos de la disposición N° 6344/96 de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica, Argentina. El ciclo estral fue analizado por medio de colpocitogramas *in fresco*, al determinar el proestro se mantuvieron por el término de 12 a 18 horas con un macho de la misma cepa. Al día siguiente, se constató en el fluido vaginal la presencia de espermatozoides para determinar el día cero de la preñez a los fines del sacrificio programado. Todos los procedimientos se realizaron con la aprobación del Comité Ético de Investigación en animales de la Universidad Nacional de Río Cuarto (CoEdI), Res. 186/2016.

Diseño experimental

Las hembras gestantes se separaron en dos grupos: control (C) y experimental (E). Las

hembras del grupo C permanecieron en sus jaulas hasta el momento del sacrificio. A las ratas del grupo E se les aplicaron sesiones de estrés por restricción de movimientos en un cepo tubular de plástico perforado, adaptado para ratas. El tratamiento se aplicó a partir del cuarto día de la gestación, hasta el día previo del sacrificio, bajo normas éticas para manejo de animales de experimentación. Se utilizó un modelo estandarizado de restricción de movimiento para inducir estrés en ratas gestantes⁷. Para la inducción del estrés, las ratas fueron trasladadas a una habitación independiente del bioterio. Con una frecuencia de día por medio se introdujo a cada una de las hembras gestantes dentro de un recipiente cilíndrico de tereftalato de polietileno (7 cm de diámetro y 19 cm de largo) durante 45 minutos. Después del periodo de restricción de movimientos las hembras fueron regresadas a su jaula. Para minimizar la variabilidad en el desarrollo de los procedimientos, todos fueron realizados por un solo experimentador. Se trabajó con un total de 30 animales, 5 para cada grupo y edad gestacional.

Sacrificio, toma y procesado de las muestras

Las ratas de ambos grupos fueron sacrificadas a los 12, 17 y 21 días de la gestación por decapitación, sin aplicación de anestésicos ya que el éter, compuestos de amonio, barbitúricos y otros anestésicos provocan alteraciones en SNC actuando como estresores¹². Inmediatamente después del sacrificio, se recolectaron muestras de sangre en tubos con heparina (200-300 µl) de ratas del grupo C y E, de todos los días de gestación estudiados. Las muestras fueron centrifugadas a 3000 rpm por 3 min a 15 °C. Luego, la fracción plasmática fue removida y almacenada a -20 °C para el análisis de CORT.

Para la inmunolocalización de VEGF se extrajeron las glándulas adrenales, se fijaron en formol tamponado al 10 % durante 12 horas y se procesaron de acuerdo a la técnica de microscopía óptica convencional. Se obtuvieron cortes seriados de 4 µm de la corteza adrenal con un micrótopo (Reichert-Jung Biocut 2035) y el montaje en portaobjetos con adhesivo (Vectabond). Se procesaron tres muestras por animal; teniendo cada uno dos cortes de la misma glándula, pero a distinto nivel de la corteza adrenal.

Determinación de los niveles de corticosterona plasmática

Los niveles plasmáticos de CORT fueron medidos por radioinmunoensayo (RIA) utilizando un antisuero de conejo altamente específico para CORT (Bioclin, Cardiff, UK) y un patrón de CORT (4-pregnenolona-11,21-diol-3,20 diona, Sigma, Boston, MA, USA). La sensibilidad del ensayo fue de 10 pg de CORT y los coeficientes de variabilidad inter e intra ensayo fueron <10 %.

Inmunolocalización de VEGF en la corteza adrenal

Para la detección de VEGF, los cortes histológicos fueron desparafinados en xilol y rehidratados. La actividad de la peroxidasa endógena fue bloqueada incubando los portaobjetos en peróxido de hidrógeno al 30 % durante 30 min. El bloqueo de anticuerpos inespecíficos se realizó con suero de caballo al 1 % durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó durante 24 horas en cámara húmeda a 4 °C con el anticuerpo primario anti-VEGF de ratón hecho en conejo (diluido 1/200, AAM51, Biorad) y se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado durante 30 min en cámara húmeda a temperatura ambiente (Vectastain ABC Elite Kit 6200, Vector Lab). Posteriormente se incubó con el complejo avidina peroxidasa por 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (Vectastain ABC Elite Kit 6200, Vector Lab). Para el control negativo, el anticuerpo primario fue reemplazado con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y como control positivo se utilizaron cortes de tejido de tumor mamario. Se reveló con Diaminobenzidina (DAB, Dako) durante 2 minutos. Finalmente, se contrastó con hematoxilina de Mayer (Dako, USA), se deshidrató con una batería de alcoholes de graduación creciente y se realizó el montaje definitivo con Depex.

Análisis de la inmunomarcación de VEGF en la corteza adrenal

Las muestras inmunomarcadas para la localización de VEGF, fueron observados con un microscopio óptico Axiophot (Carl Zeiss), adquiriendo las imágenes en un aumento de 400X con una cámara digital Powershot G6, 7.1 mega-

pixels (Canon INC, Japón) adosada al microscopio a través de la utilización del Software Axiovision Release 4.6.3 (Zeiss, Alemania). Se realizó un recorrido a lo largo de la corteza adrenal evitando la superposición de regiones del objeto de estudio. Se obtuvieron de 10 a 12 imágenes de cada corte histológico para abarcar la extensión de las distintas zonas de la corteza adrenal. En cada una de las imágenes, se cuantificó el número total de células inmunomarcadas (positivas) y el número total de células no inmunomarcadas (negativas) diferenciando las zonas de la corteza mediante el software Image J (obtenido de <http://imagej.net>). Se determinó el Índice de VEGF (I_{VEGF}) de cada zona como el cociente entre células positivas para VEGF y células totales (positivas + negativas) y se multiplicó por 100.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos verificaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de la varianza. Para la comparación de medias entre los grupos se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) utilizando el software INFOSTAT¹⁰. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Niveles plasmáticos de corticosterona

Los resultados obtenidos mediante la técnica de RIA, demuestran un incremento significativo ($p < 0,05$) de los niveles plasmáticos de CORT en el grupo E con respecto al grupo C, en todos los estadios gestacionales estudiados (Tabla 1).

Tabla 1. Efecto del estrés por inmovilización en los niveles plasmáticos de corticosterona en ratas gestantes.

Día de la gestación	Ratas control (C)	Ratas estresadas (E)
12	4,03 ± 0,91	11,36 ± 0,65 *
17	5,70 ± 0,96	10,25 ± 1,25 *
21	6,27 ± 0,86	14,02 ± 1,70 *

Los datos son expresados como media ± desvío estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y estresado se muestran con asteriscos (* $p < 0,05$).

Inmunolocalización del VEGF

El análisis inmunohistoquímico de las secciones de glándula adrenal permitió identificar cualitativamente la localización del VEGF asociada a células esteroideogénicas presentes en la zF y zLR de la corteza adrenal, mientras que no se detectó inmunomarcación en la zG. Este patrón de inmunomarcación se evidenció en todos los estadios de la gestación analizados de los grupos C y E (Figura 1). También se detectó la inmunomarcación asociada a la red de capilares (Figura 2 y 3).

Índice de inmunomarcación del VEGF en la corteza adrenal

El análisis estadístico del índice de VEGF (I_{VEGF}) evidenció una disminución significativa del

I_{VEGF} total en el día 17 en el grupo E con respecto al grupo C ($p = 0,04$), mientras que los días 12 y 21 no presentaron diferencias significativas entre los grupos estudiados (Figura 1 y 4).

Se realizó un análisis individualizado de la marcación de VEGF para cada zona de la corteza adrenal. Luego del mismo, sólo se evidenció en el día 17 una disminución significativa ($p < 0,05$) del I_{VEGF} en la zLR del grupo E con respecto al grupo C. Por su parte, en la zF no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el I_{VEGF} de ambos grupos (Figura 1 y 5).

DISCUSIÓN

En situaciones fisiológicas, la activación del eje HHA en ratas culmina con la liberación de CORT que ejerciendo una fuerte retroalimentación

negativa sobre el núcleo paraventricular del hipotálamo, la hipófisis y áreas del hipocampo para inhibir la liberación inicial de hormonas¹⁴. En este trabajo se pudo comprobar un incremento sostenido en los niveles plasmáticos de CORT en el grupo E en todos los estadios gestacionales

estudiados. Algunos autores sugieren que los niveles incrementados de CORT podrían ser causados por una disminución de los receptores de mineralocorticoides presentes en el hipocampo, alterando los mecanismos de retroalimentación del eje HHA²⁶.

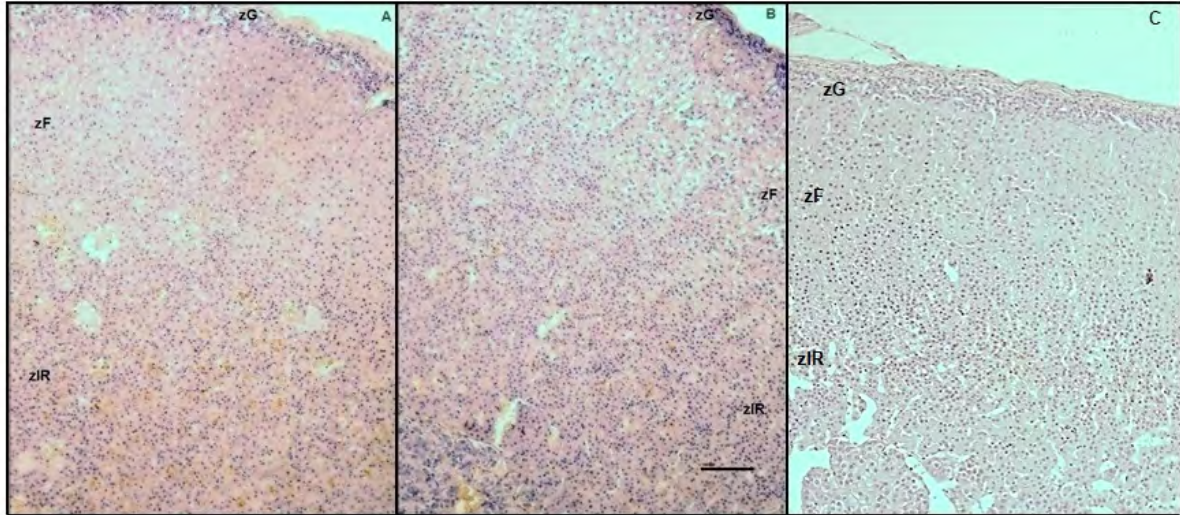


Figura 1. Localización inmunohistoquímica de VEGF en la corteza adrenal de ratas gestantes de 17 días de gestación. (A) Grupo control (B) Grupo estrés (C) Control negativo. Barra de escala = 100 μ m. Magnificación 100X. zG: zona glomerular; zF: zona fascicular; zIR: zona semejante a la reticular.

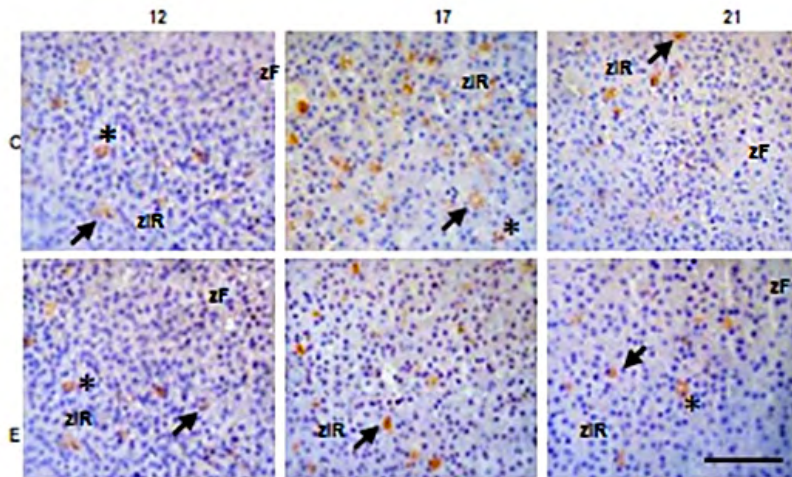


Figura 2. Localización inmunohistoquímica de VEGF en la corteza adrenal de ratas gestantes de 12, 17 y 21 días de gestación. (C) Grupo control (E) Grupo estrés. Barra de escala = 50 μ m. Magnificación 400X. zF: zona fascicular; zIR: zona semejante a la reticular. Las flechas indican células esteroidogénicas y los asteriscos capilares sanguíneos positivos para VEGF.

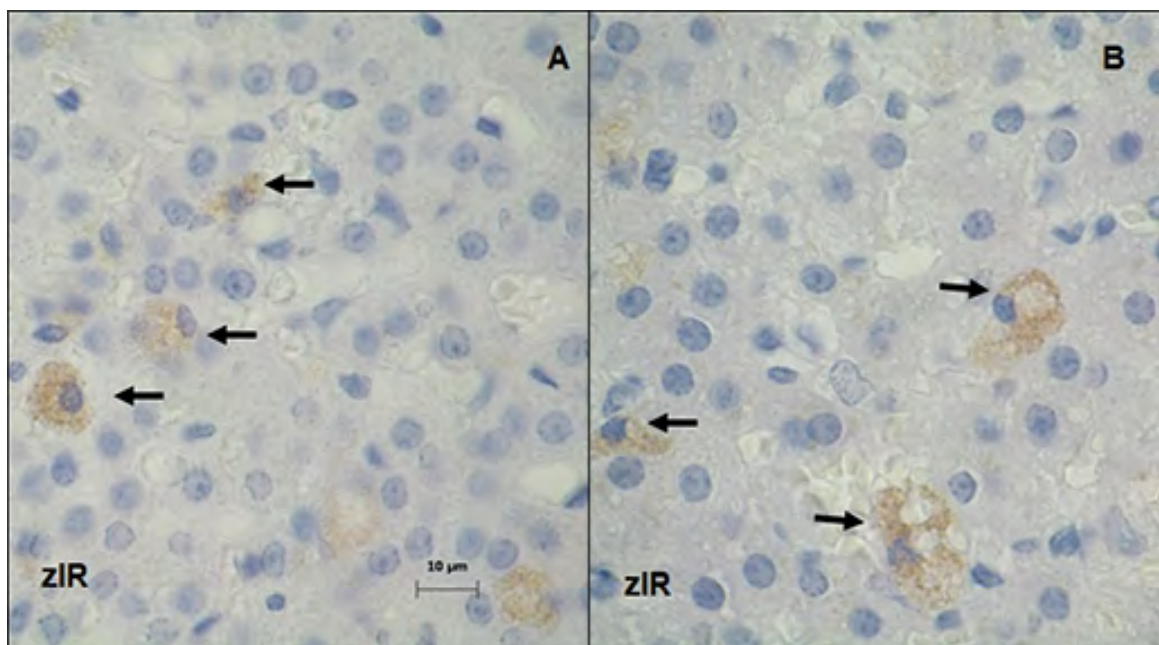


Figura 3. Localización inmunohistoquímica de VEGF en la corteza adrenal de ratas gestantes de 17 días de gestación. (A) Grupo control (B) Grupo estrés. Barra de escala = 10 µm. Magnificación 1000X. zIR: zona semejante a la reticular. Las flechas indican células esteroidogénicas positivas para VEGF.

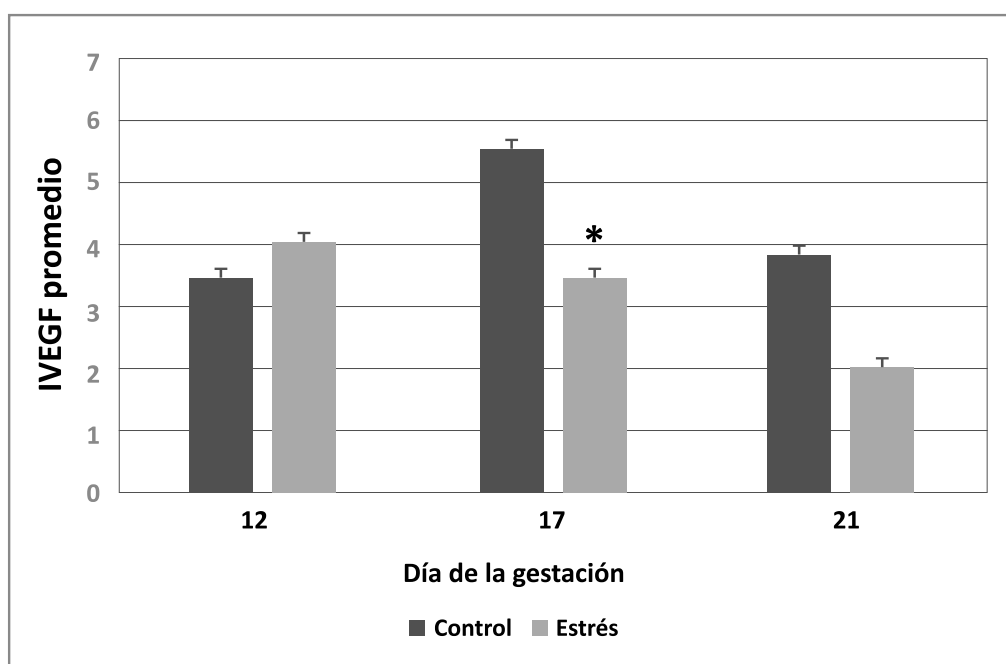


Figura 4. Índice de VEGF (IVEGF) promedio en la corteza adrenal de ratas gestantes de 12, 17 y 21 días de gestación. La coloración gris oscura indica el grupo control y la gris clara el grupo estrés. Los datos son expresados como media ± error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y estresado se muestran con asteriscos (* $p < 0,05$).

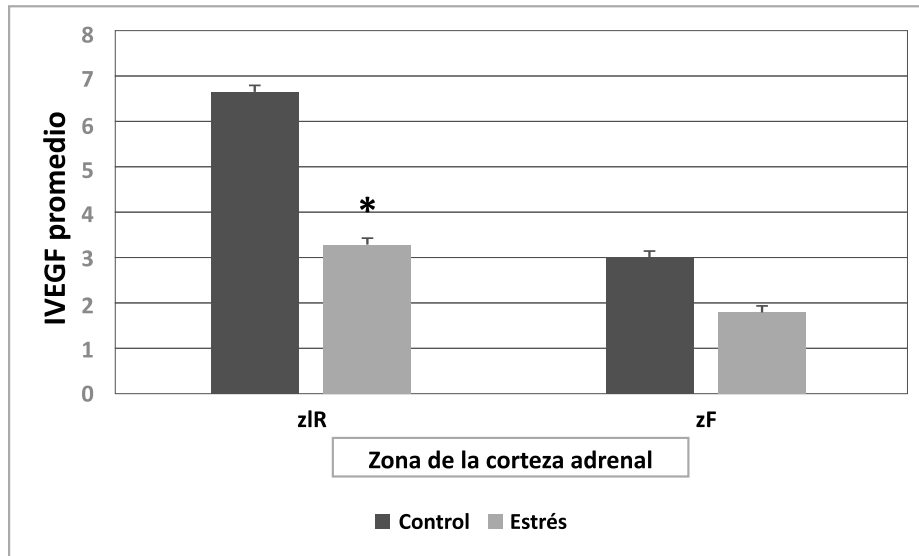


Figura 5. Índice de VEGF (I_{VEGF}) según las zonas de la corteza adrenal en el día 17 de gestación. La coloración gris oscura indica el grupo control y la gris clara el grupo estrés. Los datos son expresados como media \pm error estándar. Las diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y estresado se muestran con asteriscos (* $p < 0,05$).

La exposición a modelos de estrés crónico como la inmovilización es acompañada por una fuerte respuesta del eje HHA con progresivos retornos a la normalidad de los niveles plasmáticos de la ACTH a pesar de la persistencia de la exposición del estresor, mientras que bajo las mismas condiciones, la CORT se mantiene elevada. La causa de la disociación entre la CORT y la ACTH no es conocida, pero hallazgos similares se encuentran después de la aplicación del mismo estresor en forma crónica intermitente^{20,26}, como sucede en nuestro modelo experimental.

La glándula adrenal es uno de los órganos más vascularizados de los mamíferos adultos y bajo la regulación de la ACTH, la corteza adrenal expresa altos niveles de VEGF para el mantenimiento de su densa vasculatura^{24, 27}. Estudios realizados en cultivo primario de células fasciculares bovinas permitieron evidenciar que, si bien la ACTH estimula la expresión de VEGF, su concentración declina rápidamente debido a la baja estabilidad de su ARNm⁸. De acuerdo a estos datos, el VEGF sería expresado bajo condiciones fisiológicas y una inducción transitoria de ACTH, como la generada por el estrés, podría tener una influencia rápida pero poco estable en la expresión

de VEGF. Por otro lado, Thomas *et al.*²⁷ estudiaron el efecto de la dexametasona aplicada durante 14 días en ratas para mimetizar las condiciones de estrés crónico. Se evidenció un marcado descenso de la ACTH plasmática en las primeras 24 horas acompañado por la disminución progresiva de la expresión del VEGF durante los primeros 4 días. Posteriormente, la disminución de la red vascular y la expresión del VEGF fue más acentuada. Por lo tanto, la regresión vascular sería causada por la disminución de la expresión del VEGF como un efecto secundario a la privación de la ACTH.

En este trabajo se observó que el estrés crónico produjo una disminución del I_{VEGF} en el día 17 de la gestación, sin embargo, en el día 21 no se encontraron diferencias significativas, aunque las concentraciones de CORT se mantuvieron elevadas. Esto está en relación con la disminución sustancial en la respuesta del eje HHA tanto a estresores físicos como psicológicos que se presentan en la gestación tardía de la rata⁶. Esta adaptación es considerada fundamental para proteger al feto de los efectos del estrés y en la madre para garantizar la conducta motriz propia del trabajo de parto, minimizando así el riesgo de la programación perjudicial de los GC¹⁵. Esto

podría ser explicado por el enmascaramiento de los receptores de GC en respuesta al incremento sostenido de la CORT durante la gestación tardía en el grupo E²⁰.

Es conocido que la ACTH estimula la síntesis de VEGF en las células de la zF y la zR (zLR en ratas) luego de la administración de dexametasona¹⁷. En este trabajo, el análisis inmunohistoquímico de VEGF realizado en los días 12, 17 y 21 de la gestación en ratas C y E reveló células positivas presentes en los capilares y en las células de la zF y de la zLR de la corteza adrenal, mientras que en la zG no se detectaron células inmunomarcadas. Sin embargo, otros autores han observado células positivas para VEGF en la zG y la zF en glándulas adrenales de bovinos¹³. Esto podría deberse a diferencias que se presentan en distintas especies de animales.

Al realizar el análisis de la inmunolocalización en las diferentes zonas de la corteza adrenal a lo largo de la gestación, se evidenció una disminución del I_{VEGF} significativa en la zLR del grupo E con respecto al C en el día 17 de gestación. Estudios realizados por Bozzo *et al.*⁴, con el mismo modelo experimental revelaron que en las ratas gestantes del grupo E el proceso de apoptosis se incrementó desde la zG hasta la zLR, donde presentó los valores más elevados. A su vez, en el día 17 de gestación la proliferación celular en la zLR fue significativamente menor con respecto a las zG y la zF. Esto podría estar en relación con la teoría de migración en la corteza adrenal, que describe las zG y zF como un ambiente de proliferación, migración y diferenciación celular y a la zR (específicamente en ratas la zLR) como una región donde predomina la muerte celular¹¹. Asimismo, estudios previos evidenciaron que la modulación de la angiogénesis adrenal por la ACTH involucra a la trombospodina 2. Las células adrenocorticales de la zG y zF producen grandes cantidades de esta proteína en respuesta a ACTH promoviendo la adhesión y migración celular; la angiogénesis e inhibiendo el proceso apoptótico¹. De esta forma, su ausencia en la zLR sería un factor que contribuye a aumentar la apoptosis y disminuir la producción de VEGF.

Podemos concluir que los valores en los niveles plasmáticos de CORT determinados en este trabajo, reflejan una clara evidencia de que el estrés es crónico y que la inmovilización representa para la rata preñada un estímulo estresor intenso. De esta forma, los GC maternos y/o fetales liberados en respuesta al

estrés, que atraviesa la barrera placentaria en ratas¹⁹, afectan los procesos metabólicos y hormonales maternos que inciden en la disminución del VEGF.

BIBLIOGRAFÍA

1. Adams, J.; Lawler, J. The thrombospondins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011; 3:a009712. DOI:10.1101/cshperspect.a009712.
2. Bhatt, A.J.; Amin, S.B.; Chess, P.R.; Watkins, R.H.; Maniscalco, W.M. Expression of vascular endothelial growth factor and Flk-1 in developing and glucocorticoid-treated mouse lung. *Pediatr Res.* 2000; 47(5): 606-613.
3. Bin-Jalial, I. Inducción de lesión cerebral y depresión en ratas por estrés crónico impredecible asociado con el aumento del estrés nitrosativo y la apoptosis. *Int J Morphol.* 2020; 38(5): 1217-1222.
4. Bozzo, A.; Soñez, C.; Monedero Cobeta, I.; Rolando, A., Romanini, M.; Cots, D.; Mugnaini, M. Chronic stress and its effects on adrenal cortex apoptosis in pregnant rats. *Biotech Histochem.* 2014; 89(4): 296-303.
5. Bronson, S.; Bale, T. The placenta as a mediator of stress effects on neurodevelopmental reprogramming. *Neuropsychopharmacology.* 2016; 41(1): 207-218.
6. Brunton, P.; Russell, J.; Douglas, A. Adaptive responses of the maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis during pregnancy and lactation. *J Neuroendocrinol.* 2008; 20(6): 764-776.
7. Buynitsky, T.; Mostofsky, D. Restraint stress in biobehavioral research: recent developments. *Neurosci Biobehav Rev.* 2009; 33(7): 1089-1098.
8. Chinn, A.; Ciais, D.; Bailly, S.; Chambaz, E.; LaMarre, J.; Feige, J. Identification of two novel ACTH-responsive genes encoding manganese-dependent superoxide dismutase (SOD2) and the zinc finger protein TIS11b [tetradecanoyl phorbol acetate (TPA)-inducible sequence 11b]. *Mol Endocrinol.* 2002; 16(6): 1417-1427.
9. Chrousos, G.; Gold, P. The concepts of stress and stress system disorders: overview of physical and behavioral homeostasis. *Jama.* 1992; 267(9): 1244-1252.
10. Di Rienzo, J.; Casanoves, F.; Balzarini, M.; Gonzalez, L.; Tablada, M.; Robledo, C. InfoStat software. Córdoba, Argentina: Universidad Nacional de Córdoba. 2016.

11. Dumontet, T.; Martinez, A. Adrenal androgens, adrenarcho, and zona reticularis: A human affair? *Mol Cell Endocrinol.* 2021; 528:111239. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111239
12. Eck, J.; Kuhn, C. Effect of ether stress on growth hormone during development in the neonatal rat. *Neuroendocrinology.* 1992; 56(5): 605-610.
13. Gaillard, I.; Keramidas, M.; Liakos, P.; Vilgrain, I.; Feige, J.; Vittet, D. ACTH-regulated expression of vascular endothelial growth factor in the adult bovine adrenal cortex: A possible role in the maintenance of the microvasculature. *J Cell Physiol.* 2000; 185(2): 226-234.
14. Herman, J.P.; Figueiredo, H.; Mueller, N.K.; Ulrich-Lai, Y.; Ostrander, M.M.; Choi, D.C.; Cullinan, W.E. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol.* 2003; 24(3), 151-180.
15. Herrera, E. Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *Eur J Clin Nutr.* 2000; 54(1): S47-S51.
16. Levine, S. Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology.* 2005; 30(10): 939-946.
17. Manojlović-Stojanoski, M.; Nestorović, N.; Petković, B.; Balind, S.R.; Ristić, N.; Trifunović, S.; et al., Milošević, V. The effects of prenatal dexamethasone exposure and fructose challenge on pituitary-adrenocortical activity and anxiety-like behavior in female offspring. *Tissue Cell.* 2020; 62: 101309. DOI: 10.1016/j.tice.2019.101309.
18. Martinez, A.; Schedl, A. Dissecting a zonated organ-Special issue on adrenal biology. *Mol Cell Endocrinol.* 2022; 539: 111486. DOI: 10.1016/j.mce.2021.111486.
19. Mayer, N.; Greco, C.; Bertuzzi, M.; Rodriguez, N.; Vivas, A.; Gauna, H. Immobilization stress responses in adult rats exposed in utero to immobilization. *Stress Health.* 2011; 27(2): e1-e10.
20. Mizoguchi, K.; Yuzurihara, M.; Ishige, A.; Sasaki, H.; Chui, D.H.; Tabira, T. Chronic stress differentially regulates glucocorticoid negative feedback response in rats. *Psychoneuroendocrinology.* 2001; 26(5): 443-459.
21. Morohashi, K.I.; Zubair, M. The fetal and adult adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol.* 2011; 336(1-2): 193-197.
22. Nadal, R.; Armario, A. Mecanismos de susceptibilidad al estrés. *Hipertens Riesgo Vasc.* 2010; 27(3): 117-124.
23. Nauck, M.; Roth, M.; Tamm, M.; Eickelberg, O.; Wieland, H.; Stulz, P.; Perruchoud, A.P. Induction of vascular endothelial growth factor by platelet-activating factor and platelet-derived growth factor is downregulated by corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1997; 16(4): 398-406.
24. Popovska-Perčinić, F.; Manojlović-Stojanoski, M.; Pendovski, L.; Kjovkarovska, S.D.; Miova, B.; Grubin, J.; et al., Ajdžanović, V. A moderate increase in ambient temperature influences the structure and hormonal secretion of adrenal glands in rats. *Cell J.* 2021; 22(4): 415-424.
25. Shibuya, M. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti- and pro-angiogenic therapies. *Genes Cancer.* 2011; 2(12): 1097-1105.
26. Sosa, E.; Liaudat, A.C.; Becerra, K.; Huck, G.; Rodriguez, N. Effect of prenatal stress and forced swimming acute stress on adult rat's skeletal muscle and liver MDA levels. *MOJ Anat Physiol.* 2019; 6(6): 266-231.
27. Thomas, M.; Keramidas, M.; Monchaux, E.; Feige, J.J. Dual hormonal regulation of endocrine tissue mass and vasculature by adrenocorticotropin in the adrenal cortex. *Endocrinology.* 2004; 145(9): 4320-4329.
28. Vásquez, B.; Sandoval, C.; Sanhueza, C.; Silva, J.; del Sol, M. Efectos de las experiencias adversas temprana y tardía en las características morfológicas y estereológicas de la glándula suprarrenal de ratas sprague dawley sometidas a estrés durante su vida adulta. *Int J Morphol.* 2013; 31(1): 15-22.
29. Xing, Y.; Lerario, A.M.; Rainey, W.; Hammer, G.D. Development of adrenal cortex zonation. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2015; 44(2): 243-274.
30. Yates, R.; Katugampola, H.; Cavlan, D.; Cogger, K.; Meimaridou, E.; Hughes, C.; et al., King, P. Adrenocortical development, maintenance, and disease. *Curr Top Dev Biol.* 2013; 106: 239-312.