



**Encuentro
de Jóvenes
Investigadores**

EFFECTO DEL ESTRES CRONICO POR AISLAMIENTO Y RESTRICCIÓN DE ALIMENTOS EN LA GLANDULA ADRENAL Y EL SISTEMA REPRODUCTOR DE RATAS WISTAR HEMBRAS

Gustavo Josué, Monzón^{2,3}

¹ Cátedra de Fisiología Humana y ²Cátedra de Patología Humana. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-UNL.

³Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL-UNL-CONICET), Santa Fe.

Directora: Mariana, Fritz^{1,2,3}

Codirectora: Paola, Ingaramo^{1,3}

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Estrés, Ratas, Aislamiento.

INTRODUCCIÓN

El estrés es todo suceso capaz de alterar la homeostasis de un individuo a través de mecanismos adaptativos frente a una agresión (Selye, 1950), siendo el estrés crónico (mayor duración), capaz de causar daño al organismo. Cuando el organismo es sometido a diversas situaciones estresantes puede reaccionar de diferentes maneras, y las consecuencias que puede sufrir son leves hasta graves dependiendo del estímulo al que es sometido (Koolhaas, 2011). Uno de los sistemas que puede ser afectado de manera negativa es el reproductor femenino, y por lo tanto se podría afectar la fertilidad. Frente a situaciones de estrés se produce la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), que a su vez modula el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG), y por lo tanto se puede afectar la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la hormona folículo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y los esteroides sexuales. Esta afectación del eje HHG es debido a que la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y la hormona adrenocorticotropa (ACTH) producen una retroalimentación negativa sobre cada parte del eje HHG (Marin y Velasquez, 2010). En estudios clínicos en humanos y animales, se demostró que los niveles circulantes de ACTH se correlacionan positivamente con el tamaño de la glándula adrenal, esto explicaría la hiperplasia bilateral que se produce debido a hipersecreción crónica de ACTH en situaciones de estrés crónico (Kobayashi, 2006). A nivel del ovario el estrés puede alterar el desarrollo folicular (Roth, 2000; Ozawa, 2005; Bhat y Yajurvedi, 2011), el potencial desarrollo de los ovocitos (Lian, 2013; Gao, 2016), bloquear la ovulación y reducir la esteroidogénesis (Whirlledge y Cidlowski, 2010). Otro órgano blanco del estrés es el útero, un órgano fundamental en el proceso reproductivo óptimo de un organismo y por lo tanto de sumo interés para nuestro estudio. Algunos estudios sugieren que el estrés puede producir efectos en el útero dependiendo del tiempo de exposición y la

Título del proyecto: EFECTOS DE UNA EXPOSICIÓN POSTNATAL TEMPRANA A FORMULACIONES COMERCIALES DE GLIFOSATO SOBRE LA REMODELACIÓN UTERINA DURANTE LA GESTACIÓN

Instrumento: PICT Año convocatoria: 2018

Organismo financiador: ANPCyT Directora: Paola Ingaramo



clase de agente estresor (Divyashree y Yajurvedi, 2018; Han, 2021).

OBJETIVO

Evaluar en ratas hembra de la cepa Wistar, los efectos que tiene el estrés crónico por aislamiento y restricción de alimento y agua, sobre el ovario, el útero y la glándula adrenal.

METODOLOGÍA

Para alcanzar nuestro objetivo se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar, de 40 días postnatal (DPN40), que fueron mantenidas en el bioterio del Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL; UNL-CONICET) bajo condiciones controladas de temperatura ($22\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$), humedad (50-65%), fotoperiodo de 12 horas y alimentación. Se dividieron a los animales en dos grupos, un grupo control (C) y un grupo de estrés crónico (EC). El primero ($n=6$) tuvo acceso *ad libitum* al pellet y al agua, y se mantuvo durante todo el experimento en jaulas colectivas, para promover la socialización. El segundo grupo ($n=6$) fue aislado en jaulas individuales y privado de alimento (pellet) y agua, durante 4 hs por día durante 5 días por semana hasta el sacrificio en fase de diestro I entre los DPN91 y DPN100.

Luego del sacrificio, se obtuvieron muestras de glándulas adrenales, ovarios y útero. Las mismas fueron fijadas en formol-bufferado y luego procesadas para histología. En cortes ($5\mu\text{m}$ de espesor) de las muestras incluidas en parafina, se realizaron las coloraciones hematoxilina-eosina en la glándula adrenal, útero y ovario y picrosirius en el ovario y glándula adrenal. Además se realizó inmunohistoquímica (IHQ) para evaluar la expresión de la hormona antimuleriana (AMH, marcador de reserva ovárica) en el ovario y Ki67 (marcador de proliferación) en el útero (Tabla 1). El análisis de las determinaciones se realizó a partir de imágenes digitales. En útero evaluamos altura del epitelio luminal, espesor del estroma subepitelial, espesor del miometrio, densidad de glándulas en el estroma subepitelial a partir de la fracción de volumen (Vv) descrita por Weibel (1969) y proliferación celular en el epitelio luminal y glandular. En ovario, se hizo un recuento de los folículos primordiales, preantrales y antrales, y se cuantificó la expresión de AMH en células de la granulosa de los folículos antrales a través del cálculo de la densidad óptica integrada (DOI) mediante software. En glándula adrenal, se midió espesor de la corteza y diámetro de la glándula. Los datos obtenidos se procesaron y analizaron mediante test estadístico de Mann-Whitney.

Anticuerpos	Dilución	Proveedor
Primarios		
Anti-AMH (C-terminal)	1/200	Dako Corp. (Carpinteria, CA)
Anti-Ki67 (clone MIB-5)	1/1600	Dako Corp. (Carpinteria, CA)





Secundario		
Anti-conejo	1/200	Sigma (St. Louis, MO)

Tabla 1: Anticuerpos utilizados en los ensayos de IHQ

Efectos en los órganos de ratas Wistar hembras

En ratas que fueron aisladas y restringidas de alimentos y agua (8 ± 1 semanas) se observó un aumento del 61% de la densidad de glándulas en el estroma subepitelial ($p < 0.05$) y un aumento del 40% del espesor del estroma subepitelial ($p < 0.05$) respecto del grupo control (Figura 1 y Figura 2). A partir del recuento de folículos ováricos realizado en cortes de tejido incluidos en parafina se observó una disminución del 50% de la cantidad de folículos antrales en el grupo expuesto a estrés crónico ($p < 0,05$) respecto del grupo control (Figura 3). Además, la expresión de AMH en células de la granulosa de folículos antrales disminuyó significativamente ($p < 0,05$) en el grupo tratado (50%) con respecto del control (Figura 4). No se observaron diferencias significativas en el espesor de la corteza y en el diámetro de la glándula adrenal entre el grupo control y el expuesto a estrés crónico ($p > 0.05$).

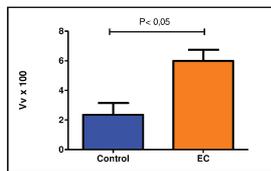


Figura 1. Densidad de glándulas en el estroma subepitelial del útero.

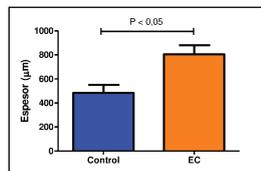


Figura 2. Espesor del estroma subepitelial del útero.

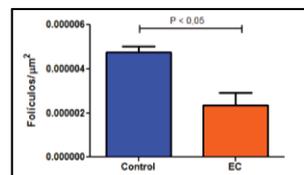


Figura 3. Recuento de folículos antrales. Los resultados se expresan como folículos antrales/ μm^2 del grupo control vs el grupo sometido a estrés crónico.

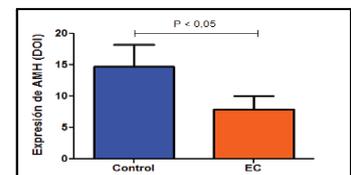


Figura 4. Expresión de AMH del grupo control vs el grupo sometido a estrés crónico.

CONCLUSIONES

Los resultados demuestran que el ovario y el útero fueron afectados por los estresores estudiados. La disminución de AMH y la densidad de folículos antrales sugieren una alteración de la función ovárica. Un aumento de las glándulas endometriales y del espesor del estroma subepitelial podría indicar un potencial desarrollo de una hiperplasia endometrial. Esta investigación es de sumo interés, ya que conjuga dos modelos estresores a los cuales los humanos fueron sometidos durante la pandemia generada por el COVID-19,



como el aislamiento, y en algunos casos escasez de alimentos. Esto permite tomar conciencia sobre los efectos que podría generar el estrés sobre órganos reproductivos.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Bhat, M.S. y Yajurvedi, H.N. 2011 Stress induced alterations in pre-pubertal ovarian follicular development in rat. *Journal of Stress Physiology and Biochemistry*, 7(4): 51-68.

Divyashree, S. y Yajurvedi, H.N. 2018 Chronic stress effects and their reversibility on the Fallopian tubes and uterus in rats. *Reproduction, Fertility and Development*, 30(2): 380-390.

Gao, Y., Chen, F., Kong, Q. y col. 2016 Stresses on female mice impair oocyte developmental potential: effects of stress severity and duration on oocytes at the growing follicle stage. *Reproductive Sciences*, 23(9): 1148-1157.

Han, J., Yang, D., Liu, Z. y col. 2021 The damage effect of heat stress and psychological stress combined exposure on uterus in female rats. *Life Sciences*, 286:1-10.

Kobayashi, H., Kambe, F., Imai, T. y col. 2006 Differential expression of cyclin-dependent kinase inhibitors, p27Kip1 and p57Kip2, by corticotropin in rat adrenal cortex. *Journal of Endocrinology*, 189(3):671-679.

Koolhaas, J.M., Bartolomucci, A., Buwalda, B. y col. 2011 Stress revisited: a critical evaluation of the stress concept. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 35(5): 1291-1301.

Lian, H.Y., Gao, Y., Jiao, G.Z. y col. 2013 Antioxidant supplementation overcomes the deleterious effects of maternal restraint stress-induced oxidative stress on mouse oocytes. *Reproduction*, 146(6): 559-568.

Marin, M. y Velasquez, L. 2010 ¿Cómo afecta el estrés calórico a la reproducción? *Biosalud*, 9(2):83-95.

Ozawa, M., Tabayashi, D., Latief, T.A. y col. 2005 Alterations in follicular dynamics and steroidogenic abilities induced by heat stress during follicular recruitment in goats. *Reproduction*, 129(5): 621-630.

Roth Z, Meidan R, Braw-Tal R y col. 2000 Immediate and delayed effects of heat stress on follicular development and its association with plasma follicle stimulating hormone and inhibin concentration in cows. *Journal of Reproduction and Fertility*, 120(1): 83-90.

Selye, H. 1950 Stress and the General Adaptation Syndrome. *British Medical Journal* 1(4667): 1383-1392.

Weibel, E.R. 1969 Stereological principles for morphometry in electronmicroscopic cytology. *International Review of Cytology*, 26: 235-302.

Whirledge, S. y Cidlowski, J. A. 2010 Glucocorticoid, stress, and fertility. *Minerva Endocrinology*, 35(2): 109-125.

