



Universidad Nacional de Córdoba
Facultad de Ciencias Exactas,
Físicas y Naturales



Tesina de grado

“PROGRAMACIÓN PERINATAL DEL SISTEMA DE OSMOREGULACIÓN: MECANISMOS NEUROADAPTATIVOS”

Tesinista: **Macagno, Agustina**

Directora: **Dra. Godino, María Andrea Del Milagro**



Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra
INIMEC - CONICET - Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Marzo de 2019

“PROGRAMACIÓN PERINATAL DEL SISTEMA DE OSMOREGULACIÓN: MECANISMOS NEUROADAPTATIVOS”

Tribunal examinador

Dra. Carrer Dolores

Firma:

Dra. Cragnolini Andrea

Firma:

Dr. Mir Franco

Firma:

Calificación:.....

Fecha:.....

Imagen de tapa: modificada a partir de
la ilustración de Azul Muñoz.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
RESUMEN	6
INTRODUCCIÓN	8
Objetivos específicos	14
MATERIALES Y METODOS	16
Consideraciones generales.....	16
Modelo de manipulación perinatal.....	16
Western blot.....	17
Inmunohistoquímica	21
Análisis de osmolaridad y electrolitos en plasma.....	24
Análisis estadístico de los resultados.....	24
RESULTADOS	25
Experimento 1	25
Efecto de la MP en la expresión del canal TRPV1 en el OVLT	25
Efecto de la MP en la expresión del canal TRPV1 en el SON.....	26
Experimento 2	28
Patrón cerebral basal de actividad o inmunoreactividad a Fra-Li en animales adultos programados y controles en los OCVs de la LT.....	28
Patrón cerebral basal de actividad o inmunoreactividad a Fra-Li y doble inmunoreactividad a Fra-AVP en animales adultos programados y controles en núcleos hipotalámicos	30
Experimento 3	34
Parámetros plasmáticos:osmolaridad y concentración electrolítica.....	34
DISCUSIÓN	35
BIBLIOGRAFIA	43

ABREVIATURAS

ABC: avidin–biotin complex

AVP: vasopresina

DAB: diaminobencidina

DPN: día postnatal

DS: diferencia significativa

ECF: fluido extracelular

Fra-AVP: inmunoreactividad doble para Fra y AVP

Fra-Li: inmunoreactividad a Fra

M±EE: media ± error estándar

MNC: células neurosecretoras magnocelulares

MP: manipulación perinatal

NaCl: cloruro de sodio

NHS: suero normal de caballo

OCVs: órganos circunventriculares

OVL: órgano vasculoso de la lámina terminalis

PaLM: núcleo paraventricular, subdivisión magnocelular lateral

PaMM: núcleo paraventricular, subdivisión magnocelular medial

PaPM: núcleo paraventricular, subdivisión parvocelular medial

PB: phosphate buffered – buffer fosfato

PVN: núcleo paraventricular

RAS: sistema renina-angiotensina

RNA_m: ARN mensajero

SFO: órgano subfornical

SON: núcleo supraóptico

TBS: Tris buffered saline

TRP: transient receptor potential cation channel

TRPV1: transient receptor potential vanilloid type 1

TRPV1-Ct: extremo C-terminal de TRPV1

WB: western blot

LT: lamina terminalis

RESUMEN

Durante períodos sensibles de la ontogenia, determinados estímulos perinatales “modelan” o inducen una “programación” diferencial de los distintos sistemas homeostáticos en desarrollo alterando su respuesta, aún a largo plazo y en ausencia del estímulo “programador”. El sistema homeostático que regula el balance hidrosalino no se encuentra exento de los efectos de la programación perinatal. Estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que el consumo materno voluntario de una dieta rica en sodio durante periodos críticos perinatales, ejerce en la descendencia un efecto a largo plazo. Es así como ante desafíos osmóticos, altera los patrones de ingesta de agua y sodio, el número de neuronas activas (ir-Fos) en núcleos cerebrales encargados de sensar la osmolaridad y/o los niveles de sodio circulantes y la funcionalidad del sistema vasopresinérgico (AVP). Estos cambios sugerirían que posiblemente el circuito osmosensor esté basalmente alterado en la descendencia, modificando las respuestas compensatorias ante un desafío hidroelectrolítico. Uno de los mecanismos por los cuales las células osmosensoras del SNC: vasopresinérgicas de los núcleos supraóptico y paraventricular (SON y PVN, respectivamente) y de los órganos circunventriculares (OCVs) de la lámina terminalis (LT), órgano subfornical (SFO) y órgano vasculoso de la lámina terminalis (OVLT), responden a cambios en la osmolaridad del medio, involucra al canal catiónico TRPV1 (de sus siglas del inglés “transient receptor potential cation channel”). El objetivo del presente trabajo es caracterizar el circuito osmosensor central a nivel celular y molecular en estado basal, luego de la programación perinatal inducida por el consumo materno voluntario de una solución de NaCl hipertónico. Para tal fin, se evaluó si el consumo voluntario de sodio hipertónico de las madres durante la gestación y lactancia es capaz de modular en estado basal tanto la expresión del canal TRPV1 como la actividad crónica celular en áreas osmosensibles y AVP hipotalámicas de la descendencia adulta. Se caracterizó a nivel molecular los efectos de la programación perinatal sobre la expresión del canal TRPV1, realizando western blot de homogenatos del SON y OVLT provenientes de animales programados (MP-Na) y controles (MP-Control). Finalmente, con el objetivo de evaluar posibles cambios crónicos en la actividad de las neuronas osmosensibles, se analizó por inmunohistoquímica la actividad basal (inmunoreactividad a Fra (Fra-LI)) tanto a nivel del SFO y OVLT, como también de las

neuronas AVP del SON y PVN (doblemente marcadas para Fra-AVP) inducidos por la estimulación perinatal.

Nuestros resultados muestran que el consumo voluntario de sodio hipertónico de las madres durante la gestación y lactancia no altera la expresión génica del canal TRPV1 a nivel del SON y OVLT. Por otra parte, los animales MP-Na tienen un aumento significativo del número de neuronas crónicamente activadas (Fra-LI) a lo largo del OVLT y vasopresinérgicas (Fra-AVP) de la subdivisión lateral magnocelular de PVN, con respecto al grupo MP-Control. Además, se observó una disminución en Fra-AVP a lo largo del SON en los animales MP-Na en comparación a MP-Control.

En suma, nuestros resultados indican que el consumo materno voluntario de una dieta rica en sodio durante periodos críticos perinatales altera basalmente la actividad del circuito osmosensor (OVLT-SON-PVN) afectando posiblemente la capacidad osmoregulatoria de la descendencia adulta ante desafíos del balance hidroelectrolítico.

PALABRAS CLAVES: Programación perinatal, TRPV1, áreas cerebrales osmosensibles, vasopresina, consumo materno de sodio hipertónico.

INTRODUCCIÓN

Estudios realizados en las últimas décadas del siglo XX han dado evidencias del importante rol del medio ambiente durante períodos críticos de la vida intrauterina y/o postnatal temprana pudiendo alterar los sistemas en formación de los individuos en desarrollo. Una de las hipótesis es la “hipótesis del origen fetal”, postulada por Barker en los años noventa (Barker, 1992 y 1994; Barker et al., 1993). La misma se basa en el principio de que las carencias nutricionales sufridas durante las etapas críticas del desarrollo fetal o en la primera infancia aumentan el riesgo de contraer enfermedades crónicas de la adultez. Estas influencias o estímulos presentes en etapas tempranas del desarrollo, particularmente durante el período intrauterino, pueden resultar en cambios permanentes de la fisiología y el metabolismo del nuevo individuo aumentando la incidencia de enfermedades de la adultez (de Boo & Harding, 2006; Lucas, 1991; Barker, 1992) como hipertensión arterial y enfermedades coronarias (Huxley et al., 2000; Barker et al., 1993 y 1989; Frankel et al., 1996; Osmond et al., 1993; Woodall et al., 1996; Langley-Evans et al., 1996; Khan et al., 2003), diabetes mellitus de tipo 2 (Eriksson et al., 2003; Dabelea & Pettitt, 2001; Sobngwi et al., 2003), accidentes cerebrovasculares (Rich-Edwards et al., 2005; Hypponen et al., 2001), obesidad (Ravelli et al., 1999; de Boo & Harding, 2006), entre otros. Es decir, durante períodos sensibles de la ontogenia, determinados estímulos perinatales “modelan” o inducen una “programación” diferencial de los distintos sistemas homeostáticos en desarrollo alterando su respuesta, aún a largo plazo y en ausencia del estímulo “programador” (Ross et al., 2005).

Gluckman y Hanson en 2005 propusieron que cuando ocurre un cambio en el entorno intrauterino, el feto sufrirá adaptaciones en su organismo para mejorar sus posibilidades inmediatas de supervivencia, siendo a menudo reversibles, aunque si los cambios del medio ambiente persisten, estas adaptaciones se tornarán irreversibles. En ese caso, estas alteraciones proporcionarán desventajas al organismo si el entorno para el cual fueron desarrolladas cambia durante etapas posteriores del desarrollo.

El sistema homeostático que regula el balance hidrosalino no se encuentra exento de los efectos de la programación perinatal (Leshem, 2009 y Mecawi et al., 2015). Experiencias perinatales de privación hídrica, sobrecarga dietaria obligada de sodio, hipernatremia sistémica, depleción de sodio o hiponatremia o cambios en la actividad del sistema renina angiotensina (RAS) modifican el patrón de ingesta de fluidos tanto en condiciones basales como inducidas ante desafíos hidroelectrolíticos de la progeñie en su etapa adulta

(Curtis et al., 2004; Crystal & Bernstein, 1995; Galaverna et al., 1995; Contreras & Kosten, 1983; Contreras & Ryan, 1990; Mouw et al., 1978; Butler et al., 2002, Mecawi et al., 2010; Argüelles et al., 2000; Vijande et al., 1996; Chadwick et al., 2009; Zhang et al., 2011; Rowland et al., 1999). Estos cambios en la conductas ingestivas tendientes a restablecer la homeostasis corporal, pueden deberse a cambios tanto en las áreas de control cerebral como en los mecanismos sensores, viéndose afectados por ejemplo los sensores de osmolaridad, natremia o receptores de hormonas como vasopresina (AVP), angiotensina II, entre otros.

En particular, estudios previos de nuestro laboratorio demuestran que el consumo materno voluntario de una dieta rica en sodio durante periodos críticos perinatales, ejerce en la descendencia un efecto a largo plazo que ante desafíos osmóticos altera:

- i) los patrones de ingesta de agua y sodio,
- ii) el número de neuronas activas (ir-Fos) en núcleos cerebrales encargados de sensar la osmolaridad y/o los niveles de sodio circulantes,
- iii) la funcionalidad del sistema vasopresinérgico.

Estos cambios observados en las respuestas homeostáticas en etapas posteriores del desarrollo sugerirían que posiblemente el **circuito/mecanismo osmosensor** esté basalmente alterado en la descendencia, modificando las respuestas compensatorias ante desafío hidroelectrolítico (ingesta de agua y sodio, liberación de AVP, etc). Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares que forman parte del mecanismo osmoreceptor central que subyacen a estos efectos de programación perinatal son aún inciertos. En consecuencia, estudiaremos sí la impronta perinatal inducida por el consumo materno voluntario de sodio produce cambios crónicos y/o alteraciones basales en el circuito/mecanismo osmosensor.

A nivel central, los osmosensores primarios están localizados a lo largo de la Lamina Terminalis (LT) en el órgano subfornical (SFO) y órgano vasculoso de la lámina terminalis (OVLT) (Johnson & Gross, 1993; McKinley et al., 2003), y en neuronas magnocelulares hipotalámicas (MNC) intrínsecamente osmosensibles, en el núcleo supraóptico (SON) y paraventricular (PVN) que se encargan además de liberar oxitocina y AVP al torrente sanguíneo (Naeini et al., 2006; Oliet & Bourque 1993; McKinley et al., 2003). Estos osmoreceptores cerebrales conjuntamente modulan las respuestas de sed y la liberación de AVP ante un aumento de la osmolaridad o hipernatremia corporal. A nivel fisiológico, este estado se produce por ejemplo, luego del consumo de alimentos con alto contenido en sodio. Un estudio pionero de nuestro laboratorio, demostró

electrofisiológicamente que las neuronas del OVLT responden a cambios en la osmolaridad, aumentando y disminuyendo su frecuencia de disparo ante estímulos hiperosmóticos/hipernatremicos e hipoosmótico/hiponatremicos respectivamente (Vivas et al., 1990). En ese sentido se ha propuesto que el OVLT es un área osmosensora clave en la inducción de la respuesta de sed tanto hiperosmótica (la sed que se gatilla por consumir alimentos con alta concentración de NaCl) como hipovolémica (la sed que se gatilla por una disminución del volumen sanguíneo o disminución de la concentración de sodio plasmática mediada por Angiotensina II) (McKinley et al., 2003, Matsuda et al., 2017, Margatho et al., 2015). Las MNCs también se comportan como osmómetros, muestran cambios reversibles en el volumen celular que son inversamente proporcionales a la osmolaridad del fluido extracelular (ECF) y éstos pueden mantenerse durante muchos minutos. Así, en principio, la modulación de los canales de transducción osmosensorial podría estar mediada por un efecto mecánico asociado con un cambio evocado osmóticamente en el volumen celular (Bourque, 2008).

La hormona AVP es sintetizada por un subconjunto de MNCs ubicadas en los núcleos hipotalámicos PVN y SON. Estas MNCs proyectan sus axones hacia la neurohipófisis, donde se produce la liberación de hormonas cuando los potenciales de acción estimulan la entrada de Ca^{+2} y la excitotoxicidad dependientes de voltaje (Bourque, 2008). Estas células liberadoras de AVP, en el SON y PVN son, por lo tanto, las neuronas de "comando" que regulan en consecuencia la diuresis a nivel renal. La velocidad de disparo de las MNC en condiciones de reposo (~1–3 Hz) media la secreción de AVP basal, mientras que las disminuciones y los aumentos en la frecuencia de disparo inhiben y aumentan la liberación de las hormonas ante estados de hipotonicidad e hipertonidad de ECF respectivamente (Figura 1) (Bourque, 2008).

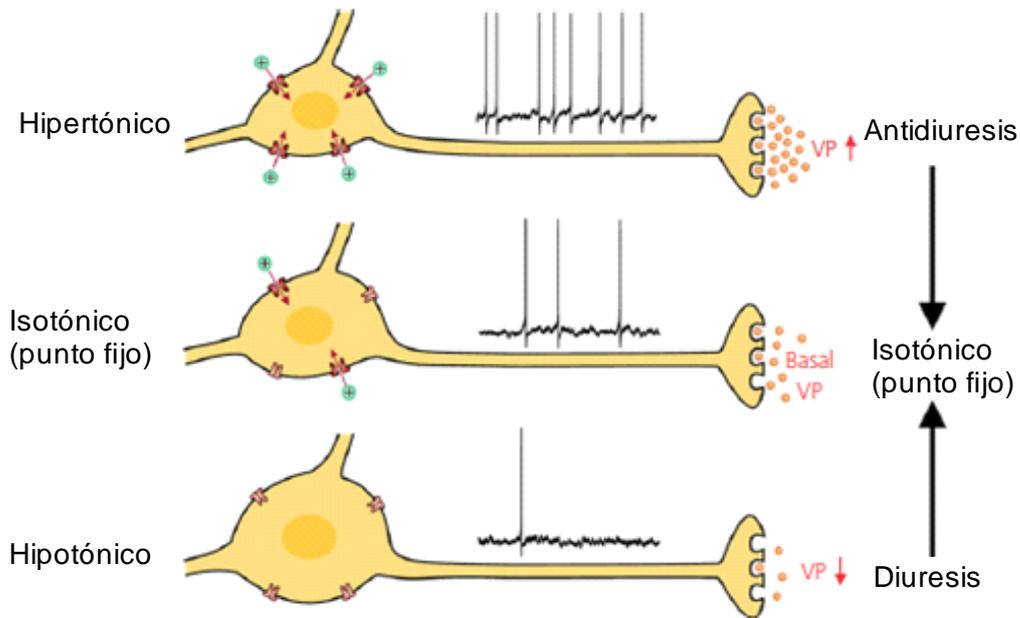


Figura 1. Las células neurosecretoras magnocelulares son intrínsecamente osmosensibles. Los cambios en la osmolaridad del ECF causan cambios inversamente proporcionales en el volumen celular. Extraído y modificado de Prager-Khoutorsky & Bourque, 2015.

Estas neuronas magnocelulares también reciben aferencias sinápticas del OVLT, el MnPO (núcleo preóptico mediano), el PBN (núcleo parabraquial) y el NTS (núcleo del tracto solitario) (Figura 2), y estudios previos han establecido que la modulación osmótica de las MNC in situ depende en gran parte de señales aferentes derivadas de osmoreceptores periféricos y de neuronas en el OVLT (Bourque, 2008).

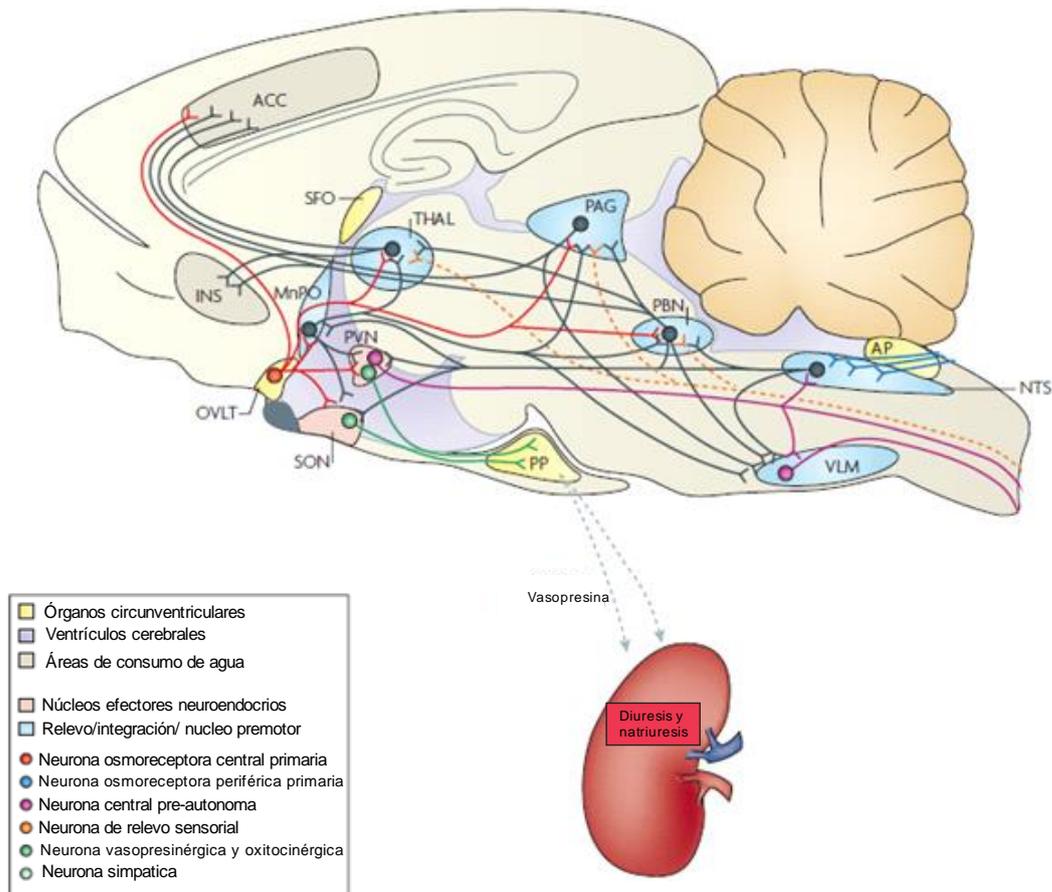


Figura 2. Circuito osmorregulador en el cerebro de mamíferos. Ilustración de un corte sagital del cerebro de rata, en el que las posiciones relativas de las estructuras y los núcleos relevantes se han comprimido en un solo plano. Las neuronas y las vías están codificadas por colores para distinguir las áreas osmosensoriales, integradoras y efectoras; más referencias de la imagen se encuentran en el cuadro adjuntada a la misma. ACC: corteza cingulada anterior, AP: área postrema, INS: insula, MnPO: núcleo preóptico mediano, NTS: núcleo del tracto solitario, OVLT: órgano vasculoso de la lámina terminalis, PAG: gris periacueductal, PBN: núcleo parabraquial, PP: pituitaria posterior, PVN: núcleo paraventricular, SFO: órgano subforminal, SON: núcleo supraóptico, THAL: tálamo, VLM: médula ventrolateral. Extraído y modificado de Bourque, 2008.

Conjuntamente las células osmosensoras del SNC: vasopresinérgicas del núcleo SON y PVN, y de los órganos circunventriculares de la lámina terminalis, tanto el SFO como el OVLT (Figura 2), presentan el canal TRPV1 (de sus siglas del inglés “*transient receptor potential cation channel*”) lo que les permite responder a cambios en la osmolaridad del medio (Prager-Khoutorsky et al., 2014 y 2015).

La familia TRP de canales iónicos lleva el nombre del mutante *Drosophila melanogaster* trp, que se caracteriza por un potencial receptor transitorio en los fotorreceptores en respuesta a la luz. Mientras tanto, ortólogos y parálogos de los canales de TRP se han

descrito en organismos que van desde simples eucariotas hasta humanos, los cuales comparten un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos. Los canales TRP están formados por monómeros con seis regiones transmembrana que se ensamblan en tetrámeros, que conforman el poro funcional permeable a los cationes. La región más conservada es el sexto dominio transmembrana, que constituye la mayor parte del revestimiento interno del poro del canal iónico. Los extremos N y C de los canales TRP están localizados en el citoplasma y, dependiendo del canal TRP respectivo, constan de varios dominios funcionales como repeticiones de anquirina, manos EF que detectan Ca^{2+} , sitios de fosforilación, sitios de unión a calmodulina y un llamado 'TRP box'. En base a su secuencia, la familia TRP de mamíferos se diferencia en seis subfamilias de canales iónicos: TRP canónico (TRPC), TRP vaniloide (TRPV), TRP melastatina (TRPM), TRP policistina (TRPP), TRP mucolipina (TRPML) y TRP ankyrin (TRPA) (Clapham, 2003 y Goswami & Hucho, 2008).

TRPV1 es el miembro fundador de la subfamilia vaniloidea de los canales TRP, y detecta varios agonistas endógenos como por ejemplo N-araquidonoil-dopamina, y estímulos exógenos nocivos, como la capsaicina y la temperatura alta. TRPV1 es un canal catiónico no selectivo con alta permeabilidad para Ca^{2+} (Goswami & Hucho, 2008; Immke & Gavva, 2006).

La apertura o cierre de este canal mecanosensible es el que regula los cambios en la frecuencia de disparo de las células osmosensoras. La **transducción osmosensorial** en las neuronas osmosensoriales está mediada por una variante N terminal del canal catiónico TRPV1, que se activa durante la contracción provocada por hipertonicidad (por encima del valor fisiológico de 290-300 mOsm) (Ciura y Bourque, 2006; Sharif Naeini et al., 2006). Los estudios del grupo liderado por el Dr. Bourque (Prager-Khoutorsky et al., 2014, 2015) han mostrado que en neuronas osmoreceptoras primarias del OVLT y del SON existe una población de microtúbulos (MT) dinámicos que interactúan directamente con el canal iónico TRPV1 regulando su actividad y la respuesta de estas células a cambios en el ambiente osmótico.

Teniendo en cuenta los componentes del mecanismo osmosensor central y nuestros antecedentes (Macchione y cols., 2012, 2015) que demuestran que el consumo voluntario materno de una solución hipertónica de sodio durante todo el periodo de gestación y lactancia modifica el consumo de agua y sodio, la expresión del RNAm de AVP y la actividad aguda evidenciada por inmunoreactividad a c-Fos (ir-Fos), de las áreas osmosensoras de la descendencia adulta frente a desafíos osmóticos como la sobrecarga

o depleción de sodio corporal, es que resulta coherente pensar que el circuito/mecanismo osmosensor central es un sistema neuroplástico, susceptible a los estímulos perinatales durante la ontogenia temprana de los organismos.

En suma, en base a lo expuesto es posible **hipotetizar** que la programación perinatal inducida por el consumo voluntario de sodio hipertónico provoca en la descendencia cambios adaptativos crónicos en el mecanismo osmoreceptor, los cuales afectan el nivel de activación de estas células alterando tanto la conducta ingestiva como la síntesis y/o liberación hipotalámica de vasopresina.

El **objetivo general** del presente proyecto es caracterizar el circuito osmosensor central, en la descendencia adulta, a nivel celular y molecular en estado basal, (sin estímulo o desafío posnatal) por los cuales la impronta del consumo materno voluntario de sodio, provoca los cambios comportamentales y neuroendocrinos observados previamente en las crías adultas. En el presente proyecto se evaluó si la impronta perinatal inducida por el *consumo voluntario de sodio hipertónico de las madres durante la gestación y lactancia* fue capaz de modular crónicamente tanto la expresión del canal TRPV1 en áreas osmosensibles, como la actividad (crónica-basal) de neuronas del OVLT y SFO y vasopresinérgicas a nivel hipotalámico. Para tal fin, caracterizamos a nivel celular los efectos de la programación perinatal sobre la expresión del canal TRPV1, realizando western blot de homogenatos de tejido correspondiente al SON y al OVLT provenientes de animales programados y controles. Finalmente, con el objetivo de evaluar posibles cambios en el nivel de activación de las neuronas osmosensibles, analizamos por inmunohistoquímica la actividad crónica basal, evidenciada por la inmunoreactividad de Fra, tanto de las células a nivel del SFO, OVLT como de las neuronas vasopresinérgicas del SON y PVN (doblemente marcadas para AVP y Fra) inducidas por la estimulación perinatal.

Objetivos específicos

Objetivo 1: Analizar si existen cambios en la expresión génica del canal TRPV1 en el OVLT y SON como resultado de la programación perinatal a través del análisis de western blot.

Objetivo 2: Analizar por inmunohistoquímica el número de neuronas crónicamente activadas, inmunoreactivas a Fra, en el SFO y OVLT en animales programados y controles.

Objetivo 3: Analizar por inmunohistoquímica el número de neuronas vasopresinérgicas crónicamente activadas, doblemente marcadas para AVP y Fra, en el SON y PVN en animales programados y controles.

MATERIALES Y METODOS

Los animales de experimentación fueron ratas machos de la cepa Wistar de 2 meses de edad (entre 200-250 gramos) las cuales fueron mantenidas en el bioterio del Instituto de Investigación Médica Mercedes y Martín Ferreyra, en jaulas individuales en una habitación con un ciclo de luz-oscuridad de 12:12h y temperatura controlada entre 20-22° C. Cada animal fue provisto de agua y dieta comercial (conteniendo aproximado 0.18% NaCl) *ad libitum*.

El manejo de animales y los protocolos experimentales cuentan con la aprobación del Comité de Ética que rige las normas de cuidado y uso de los animales de experimentación del Instituto (Cicual 20170803), de acuerdo con la Guía del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (NIH).

Apareamiento, gestación, lactancia y destete.

Tal como se puede observar en la figura 3 que se encuentra a continuación, las hembras adultas se mantuvieron durante un período de adaptación de una semana en las condiciones correspondientes a cada manipulación perinatal (MP), es decir, a los animales programados se les ofreció *ad libitum* agua, comida y solución de NaCl hipertónico (0.45M); por otro lado a los animales controles de la programación solo agua y comida. Posteriormente las hembras se colocaron en jaulas con machos adultos para el apareamiento, manteniendo el acceso a la solución hipertónica de sodio en el caso de corresponder, la cantidad de días necesarios hasta encontrar la presencia de espermatozoides en vagina. Una vez confirmada la preñez, las hembras gestantes se colocaron en cajas individuales manteniendo las condiciones correspondientes. El día del parto fue tomado como día posnatal 0 (DPN0). Al DPN21, se procedió a realizar el destete de cada camada, momento en el cual las madres y sus crías hembra fueron eliminadas del protocolo experimental. Los machos destetados al DPN21 permanecieron en las mismas condiciones de MP hasta el DPN28 permaneciendo juntos como camada hasta la realización de los experimentos, para disminuir el estrés por aislamiento. Luego del DPN28 hasta que alcanzaron la adultez (DPN60), los animales conservaron condiciones estándares de agua y comida *ad libitum* hasta que posteriormente fueron sometidos a los diferentes procedimientos experimentales según se detalla en actividades para cada objetivo.

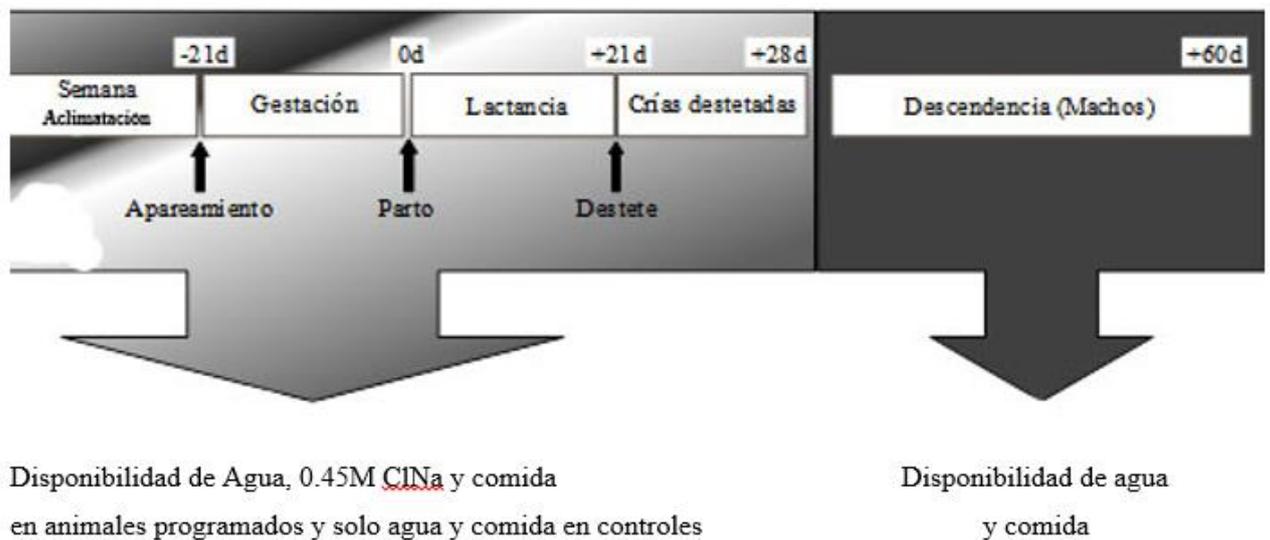


Figura 3. Esquema general del diseño experimental realizado como manipulación perinatal (MP).

Grupos experimentales

- Grupo control no expuesto a NaCl: MP-Control. Animales con agua y comida ad libitum.
- Grupo programado expuesto a NaCl: MP-Na. Animales con agua, comida y solución de cloruro de sodio hipertónica (0.45M) ad libitum.

1. WESTERN BLOT

Obtención de muestras

En primer lugar, los animales utilizados fueron sacrificados por decapitación, procedimiento que se llevó a cabo en la sala de cirugía del bioterio del Instituto. Los cerebros fueron extraídos inmediata y cuidadosamente con elementos quirúrgicos, los mismos se preservaron en papel aluminio en hielo seco (hasta finalizar con la recolección de muestras) y se transfirieron a un freezer que los mantuvo a -80°C hasta el momento del procesamiento del tejido.

Los cerebros congelados fueron cortados en un micrótopo de congelación extrayéndose rebanadas de tejido de 600 micras de dos áreas: OVLT y SON, de acuerdo al atlas de

Paxinos (Paxinos y Watson, 1997). En primer lugar se extrajo el OVLT para lo cual se realizó un solo corte de 600 micras, por otra parte, para el SON se escindieron 1200 micras de tejido, es decir, dos rebanadas de 600 micras. Una vez obtenidos los cortes se recolectó una muestra correspondiente al área de interés específicamente, descartándose el tejido cerebral restante. Por medio de la ayuda de un sacabocado de acero inoxidable (1,5mm diámetro interno y 2mm diámetro externo) se extrajeron los “*multipunches*” correspondientes al OVLT (un punch central, Figura 4) y cuatro punch para el SON (Figura 5). Los punch al ser extraídos se colocaron en un buffer con TBS 1X, 1 % de Tritón 100X, 1% de NP40 y un coctel inhibidor de proteasas para proceder a su homogenización mecánica.

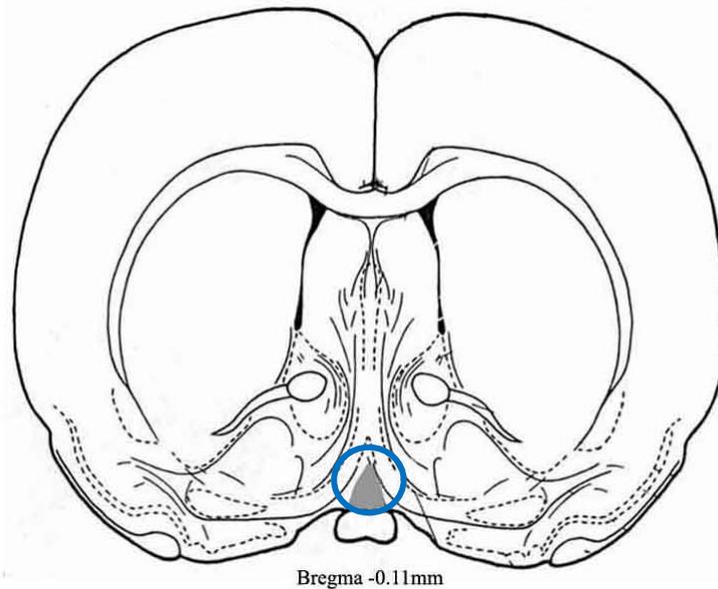


Figura 4. Diagrama de un corte coronal del cerebro de rata. El círculo celeste representa la región donde se realizó el punch para extraer el OVLT. Extraído y modificado de The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem, Koning & Klippel, 1963.

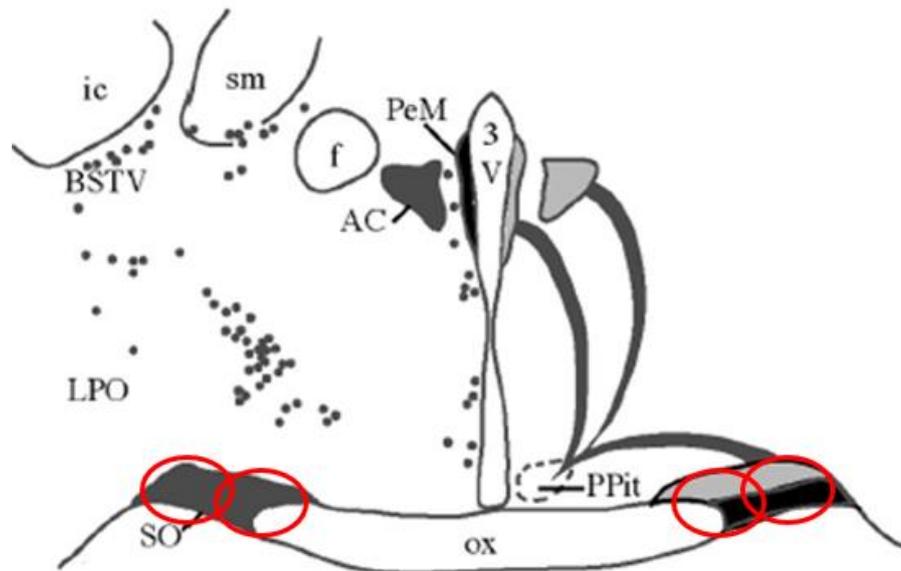


Figura 5. Representación esquemática de la distribución de las neuronas neurosecretoras magnocelulares en las principales divisiones del núcleo supraóptico (SON), paraventricular (PVN), y núcleos accesorios (Acc) y sus proyecciones eferentes. Los círculos rojos representan las regiones donde se realizaron los punches para extraer el SON. Extraído y modificado de Paxinos, 2004.

Las muestras fueron homogeneizadas con jeringas utilizando agujas 0,5 x 16 mm 25G 5/8, este procedimiento se repitió hasta el momento en que no se observaron trozos de tejido. Los homogenatos se centrifugaron en frío (4°C) a 13000 rpm por 5 minutos, luego se recolectó el sobrenadante y el pellet fue descartado.

Cuantificación de proteínas

A partir del sobrenadante recolectado luego de la centrifugación se recogieron aproximadamente 7-10 microlitros de cada muestra, los cuales se utilizaron para determinar la concentración de proteínas de acuerdo a la técnica de Lowry (Lowry et al., 1951) utilizando un kit comercial de reactivos (Bio-Rad *DC Protein Assay*). Este estudio fue llevado a cabo en microplacas de 96 pocillos donde se cargaron las muestras cuya cantidad de proteínas era de interés cuantificar. La lectura de las placas se realizó en un espectrofotómetro ELISA (NanoDrop), obteniendo los valores de absorbancia a 750 nm. A partir de los valores de absorbancia obtenidos se construyó un gráfico de dispersión, a partir del mismo se obtuvo la ecuación de la recta con la que fue posible calcular la cantidad de microgramos de proteína por microlitro de muestra ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$).

Electroforesis

Las muestras fueron preparadas agregando buffer Laemmli 2X (0,125M TRIS-HCl, pH: 6,8, 4% SDS 4%, 20% Glicerol y azul de bromofenol) con 6% β -mercaptoetanol; las mismas se calentaron a 95°C por 5 minutos para desnaturalizar las proteínas. Se sembraron 40 μ g de proteína total por carril en geles de poliacrilamida al 10% con SDS (PAGE-SDS). Las proteínas fueron separadas por electroforesis a 80V constante. A continuación se procedió a la transferencia de las proteínas separadas desde el gel hacia una membrana de nitrocelulosa de 0,2 μ m (Bio-Rad) mediante la técnica de transferencia húmeda a voltaje constante de 25V, durante toda la noche, a 4°C. Finalizada la transferencia, las proteínas presentes en la membrana se tiñeron con solución de rojo Ponceau para corroborar el correcto traspaso.

Inmunodetección

La membrana fue incubada por dos hora a temperatura ambiente en una solución de TBS con Tween al 0,05% (solución TTBS) y con leche descremada al 5%, para bloquear las uniones inespecíficas. A continuación se incubó con el anticuerpo primario policlonal anti-TRPV1 rabbit (dilución 1:500 - Alomone, número de catálogo: ACC-030), durante toda la noche, a 4°C en agitación. Posteriormente a la membrana se le realizaron tres lavados de 5 minutos con TTBS y fue incubada con el anticuerpo secundario fluorescente anti-rabbit (dilución 1:3000 - LI-COR 800) durante una hora a temperatura ambiente, en agitación. A continuación, la membrana fue revelada por fluorescencia en el rango infrarrojo mediante scanner Odyssey (LI-COR Biosciences).

Para comprobar que se hubiesen sembrado las mismas cantidades de proteína en todos los carriles, se procedió a la determinación y revelado de proteínas control en la misma membrana, incubándola con el anticuerpo primario monoclonal anti-GAPDH mouse (dilución 1:2500 – Ambion, USA) y con el anticuerpo primario monoclonal anti- α tubulina mouse (dilución 1:50000 –Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) durante toda la noche, a 4°C en agitación. Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 minutos con TTBS y se incubó con el anticuerpo secundario fluorescente anti-mouse (dilución 1:5000 - LI-COR 680) durante una hora a temperatura ambiente y en agitación. Luego la membrana fue revelada por fluorescencia en el rango infrarrojo mediante scanner Odyssey (LI-COR Biosciences).

Las bandas obtenidas fueron cuantificadas, incluyendo el área e intensidad de la banda, utilizando el programa de análisis de imágenes FIJI (<http://fiji.sc/>) utilizando el plugin

Gel Analyzer. Se efectuó un cociente entre la banda de proteína de interés (TRPV1 y GAPDH o Tubulina). Luego los valores obtenidos para el grupo MP-Na fueron normalizados con respecto a su correspondiente grupo MP-Control y sobre los valores normalizados se efectuó el análisis estadístico.

2. INMUNOHISTOQUÍMICA

Obtención de la muestra

A los fines de analizar los efectos crónicos en las distintas áreas cerebrales involucradas en la regulación del balance hidrosalino, producidos por la manipulación perinatal, los cerebros de los animales programados y controles fueron fijados cuando alcanzaron la adultez (60 días) y sin ninguna manipulación posnatal, tal como se describe a continuación. Alcanzada dicha edad, fueron anestesiados y perfundidos intracardialmente por el ventrículo izquierdo con solución salina 0,9% con heparina y posteriormente con paraformaldehído 4%. Luego se procedió a la extracción de los cerebros, los cuales fueron sumergidos por 24 horas en fijador y luego se colocaron en una solución de sucrosa al 20% hasta el momento del procesamiento de los mismos. Posteriormente se continuó con el procedimiento inmunohistoquímico que se detalla inmediatamente después.

Procedimiento Inmunohistoquímico

Los cerebros fueron cortados en secciones coronales de 40 μ m utilizando un micrótomo de congelación. Los cortes fueron lavados tres veces por 5 minutos en PB 0.01M. Luego se realizó un bloqueo de la peroxidasa endógena de las secciones por una hora en agitación utilizando una solución de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) 10% y metanol 10%. Posteriormente se lavaron los cortes en PB 0.01M tres veces por 5 minutos y se bloquearon las uniones inespecíficas incubando las muestras en una solución de suero normal de caballo (NHS) al 10% durante una hora en agitación.

Todos los cortes de cada cerebro fueron primero procesados para la inmunomarcación nuclear a Fos, utilizando el anticuerpo policlonal anti-Fos rabbit (c-fos K25, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), el cual reconoce los aminoácidos 128- 152 en la región NH₂ de Fos, siendo capaz de unirse a la proteína Fos, Fos B, Fos 1 y Fos 2. Los cortes fueron mantenidos en solución de incubación toda la noche a temperatura ambiente en agitación, la cual contenía 0.3% Tritón, 2% de Normal Horse y el anticuerpo primario

(dilución 1:1000). Al día siguiente, los cortes se lavaron tres veces por 5 minutos en PB 0.01M. Inmediatamente después se procedió a la incubación en el anticuerpo secundario biotinilado específico contra la especie donde se corrió el anticuerpo primario, anti- rabbit (dilución 1:250 en NHS 1% - PB 0.1 M) durante una hora en agitación. Nuevamente se realizaron tres lavados como se mencionó anteriormente. Los cortes fueron incubados en el complejo ABC, avidin-biotin-peroxidasa, (dilución 1:200 - Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), el cual se preparó adicionando dos gotas de agente A y dos gotas de agente B en 5 ml de PB 0.1M. Se realizaron tres lavados en PB 0.01M de 5 minutos cada uno. Subsiguientemente se procedió al revelado utilizando Diaminobencidina (DAB - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) como cromógeno. A fin de distinguir los colores de las inmunomarcas nuclear y citoplasmática, la reacción de Fra-Li se reveló agregando cloruro de cobalto y sulfato de níquel ambos al 1%, al medio con DAB (DAB intensificada), lo cual da al producto de reacción nuclear un color violeta oscuro, diferente del característico marrón de la peroxidasa a nivel citoplasmático que se utilizó posteriormente para marcar AVP.

Por último, para la marcación citoplasmática de AVP, se utilizó un anticuerpo primario policlonal anti-AVP rabbit (dilución 1:1000 - ir-AVP - generosamente donado por el Dr. Harold Gainer- NIH, Bethesda, USA). Luego se procedió a la incubación en el anticuerpo secundario biotinilado anti- rabbit (dilución 1:250 en NHS 1% - PB 0.1 M), durante una hora en agitación. El revelado se realizó procediendo de igual manera que con Fra-Li, pero en este caso a la solución de DAB no se le agregaron sales, tal como se mencionó anteriormente, para diferenciar la marca nuclear de la citoplasmática.

Finalmente, los cortes fueron montados en portaobjetos utilizando Gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/Alcohol 80%), los cuales se dejaron secar a temperatura ambiente, luego se colocaron en Xileno para desengrasarse, se cubrieron con medio de montaje y por último se colocó el cubreobjetos. La visualización microscópica del tejido permitió el análisis del patrón espacial de las inmunomarcas que luego se analizaron empleando un sistema de videomicroscopía. Las imágenes fueron capturadas por una cámara de vídeo de alta resolución, la cual se encuentra acoplada a un microscopio Axioskop 35M (Zeiss), provisto de óptica para campo claro. Luego se enviaron a una computadora dotada de un programa digitalizador y cuantificador de imágenes (Videoblaster/ ScionImage, NIH). El procedimiento de inmunomarcación doble y el método de cuantificación que se utilizó fue previamente descrito por Godino et al., 2015.

Previamente en nuestro laboratorio se evaluó la especificidad de los anticuerpos c-Fos (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) y Fra-Li (c-fos K25, Santa Cruz Biotechnology, SantaCruz, CA, USA), en otro modelo animal, en estado basal (Figura 6). Se observó que prácticamente no hay marcación c-Fos (utilizando el anticuerpo Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) y si se observa inmunomarcación para Fra-Li (utilizando el anticuerpo c-fos K25, Santa Cruz Biotechnology, SantaCruz, CA, USA), corroborando que esta última se mantiene presente por periodos largos de tiempo posteriores al estímulo.

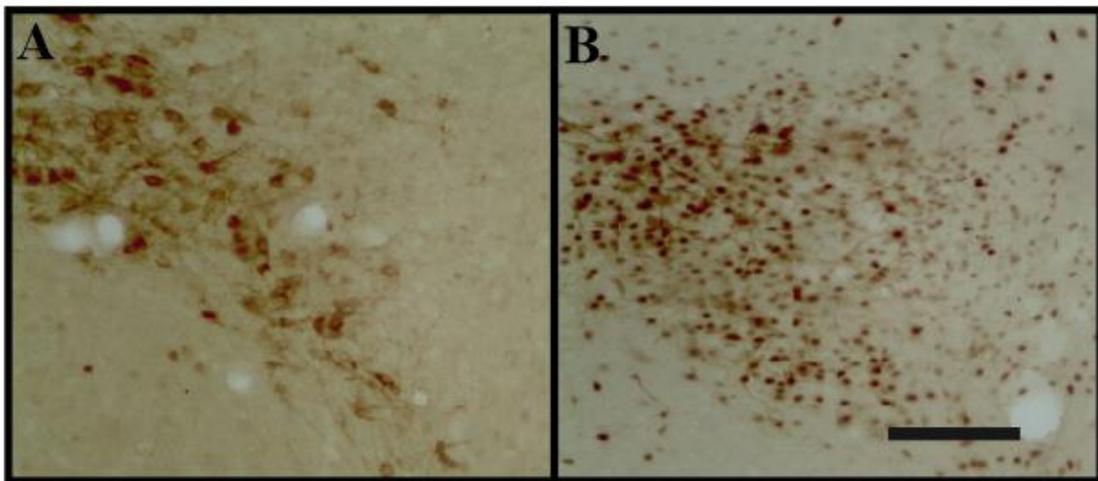


Figura 6. Microfotografía que muestra en el PaMM la inmunoreactividad a c-Fos (A) y Fra-Li (B) en secciones secuenciales del mismo animal. Se puede observar que en estado basal no se observa prácticamente marca de c-Fos y si abundante marca de Fra-Li, validando la marca crónica observada por el anticuerpo k25 en nuestro modelo (Magnificación 10X). Barra de escala: 100 μ M.

Análisis cuantitativo y citoarquitectónico

Los núcleos cerebrales analizados fueron identificados y delimitados de acuerdo al atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1997). En el PVN el número de núcleos Fra-Li positivos fue contado en dos subnúcleos: magnocelular medial (PaMM) y magnocelular lateral (PaML), cuya distancia del bregma es -1,30 mm y -1,8mm, respectivamente. La inmunomarcación a Fra-Li de las neuronas pertenecientes a los núcleos restantes fue analizada en un solo nivel. La distancia en relación al bregma de cada núcleo analizado se menciona a continuación, SON: -0.8 mm (sección anterior) y -1.3mm (sección posterior), SFO: -0.92mm, OVLT: -0.20mm.

La inmunoreactividad a Fra-Li nuclear fue cuantificada utilizando un sistema computarizado que incluye un microscopio Zeiss acoplado con una cámara digital Leica DC 200. Las células positivas para Fra-Li en cada sección y la doble marcación fueron analizadas manualmente mediante la visualización en el microscopio de la sección representativa y sin conocer el grupo al cual pertenecía la sección. El recuento se realizó en cuatro animales de cada condición experimental y se repitió al menos dos veces en cada sección analizada.

3. ANALISIS DE OSMOLARIDAD Y ELECTROLITOS EN PLASMA

Para llevar a cabo este procedimiento se utilizó el mismo grupo de animales que para el ensayo de western blot. Las muestras de sangre troncal se recolectaron en tubos de polipropileno de 15ml que contenían 50 μ l EDTA (2 mg/ml de sangre), inmediatamente las mismas fueron centrifugadas (en una centrífuga Eppendorf®, Model 5415D) en frío (4°C), a 3000 rpm por 20 minutos. Luego, se recolectó el plasma (sobrenadante), descartándose el pellet. Las muestras de plasma fueron almacenado a -20°C hasta el momento del análisis.

Se determinaron los siguientes parámetros:

- Osmolaridad plasmática, la cual fue determinada utilizando un osmómetro de presión de vapor (VAPRO 5520).
- Concentración de electrolitos plasmáticos, para la determinación de la concentración de electrolitos ($[Na^+]$, $[Cl^-]$), se utilizó la técnica de Ión Selectivo (Ion Selective Electrode; Hitachi Modular P+ISE. Roche Diagnostic, Mannheim, Alemania).

Análisis estadístico de los resultados

Para el ensayo de western blot, para el análisis inmunohistoquímico, para el análisis de la inmunomarcación simple (Fra-Li) y doble (Fra-AVP), y para los parámetros plasmáticos se realizó un test de Student (t-test), comparando siempre el grupo MP-Control con el grupo MP-Na. En todos los casos los resultados fueron expresados como Media (M) \pm Error Estándar (ES). Un nivel de $p \leq 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

RESULTADOS

Experimento 1

Efecto de la programación perinatal sobre la expresión del canal TRPV1 en el OVLT.

Como se describió previamente en la introducción, diversos estudios demostraron que TRPV1 se activa por los cambios en el volumen celular ocasionados (contracción) por el aumento en la osmolaridad del líquido extracelular. Como una primera aproximación en este trabajo se analizó la expresión del canal iónico TRPV1 en el OVLT, una de las áreas cerebrales dotada de neuronas osmosensoras intrínsecas del SNC, para evaluar si existe algún efecto de la programación perinatal a este nivel.

El análisis estadístico del cociente entre la marca de TRPV1 y su control carga tubulina ($t_{2,78} = -0,06$; $p = 0,96$) muestra que no hay diferencias significativas en la expresión proteica de TRPV1 en animales pertenecientes al grupo MP-Na, con respecto a los del grupo MP-Control (Figura 7 A). En la figura 7 B se muestran imágenes representativas de las bandas de cada condición experimental. Tubulina forma parte del citoesqueleto, que media la contracción celular, para descartar que el resultado esté influenciado posiblemente por este efecto, normalizamos además las bandas de TRPV1 con GAPDH (un control de carga alternativo) y se observó un resultado similar (datos no mostrados). Estudios futuros que exceden esta Tesina intentarán demostrar si la programación perinatal induce cambios en la interacción de este canal iónico y componentes del citoesqueleto.

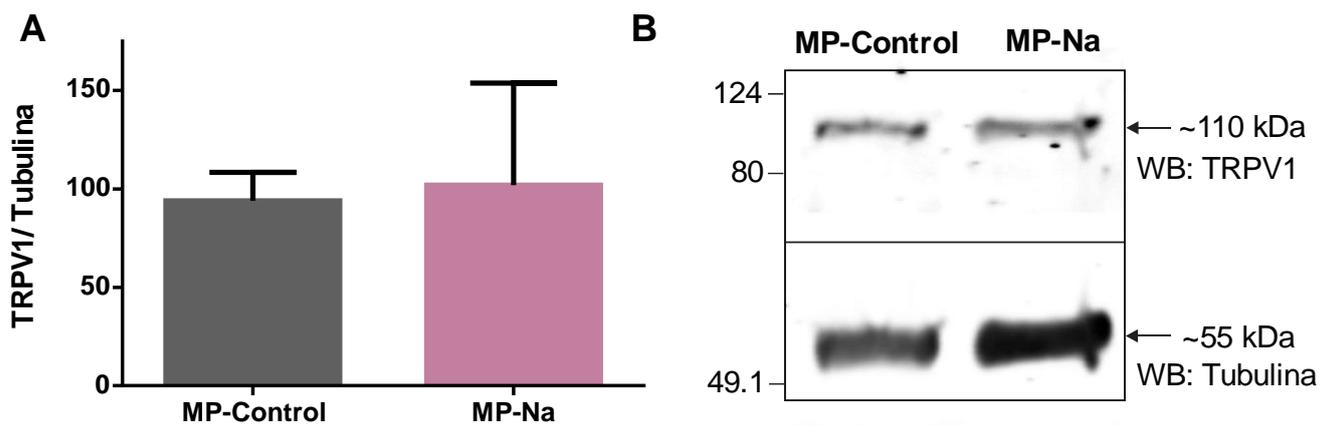


Figura 7. Expresión de TRPV1 en el OVLT (A) Cuantificación de TRPV1 normalizado con Tubulina (unidades arbitrarias normalizadas al 100% en el control) en el OVLT. Cociente (TRPV1/Tubulina) de las lecturas correspondientes a las bandas expresadas en unidades densométricas arbitrarias, en animales pertenecientes al grupo MP-Control (n=2) y MP-Na (n=4). Los valores se expresan como M±EE **(B)** Inmunoblot representativo mostrando la expresión de TRPV1 con su respectivo control de carga, en el OVLT, en animales pertenecientes al grupo MP-Na, con respecto al grupo MP-Control.

Efecto de la programación perinatal sobre la expresión del canal TRPV1 en el SON.

Posteriormente se analizó la expresión del canal TRPV1 en el SON, el cual posee las células neurosecretoras magnocelulares liberadoras de AVP que también son osmosensoras intrínsecas debido a la presencia de TRPV1. Al no encontrar cambios en el OVLT y sabiendo que el mismo envía proyecciones axonales al SON, se evaluó si existía algún efecto de la programación perinatal a este nivel.

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión del TRPV1 (normalizado con tubulina) en el grupo MP-Na comparado con el control ($t_{2,45}=0,63$; $p=0,54$) (Figura 8). En la figura 8 B se muestra un inmunoblot representativo perteneciente a cada una de los grupos experimentales.

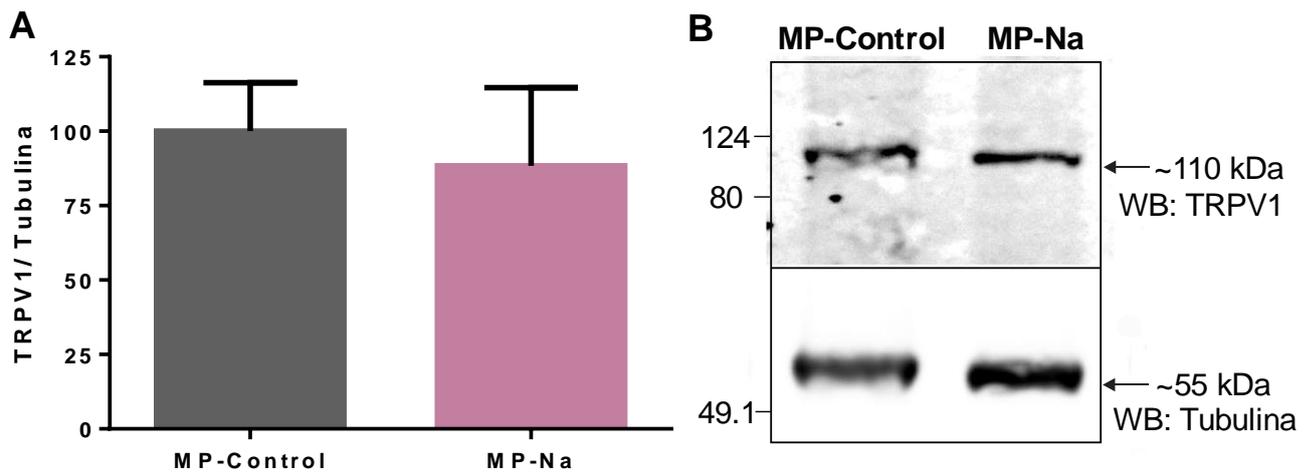
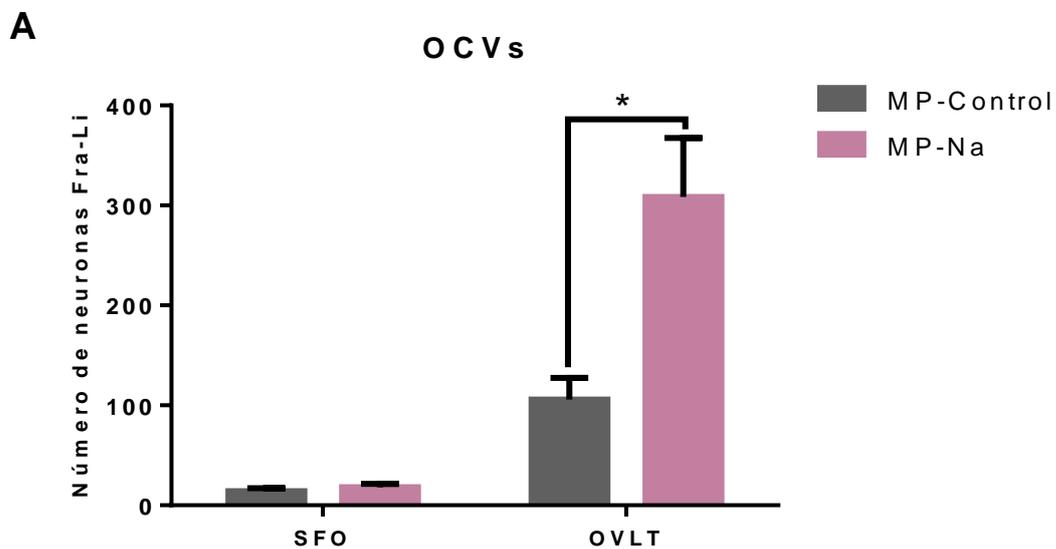


Figura 8. Expresión de TRPV1 en el SON (A) Cuantificación de TRPV1 normalizado con Tubulina (unidades arbitrarias normalizadas al 100% en el control) en el SON. Cociente (TRPV1/Tubulina) de las lecturas correspondientes a las bandas expresadas en unidades densométricas arbitrarias, en animales pertenecientes al grupo MP-Control (n=4) y MP-Na (n=4). Los valores se expresan como $M \pm EE$ **(B)** Inmunoblot representativo mostrando la expresión de TRPV1 con su respectivo control de carga en el SON, en animales pertenecientes al grupo MP-Na, con respecto al grupo MP-Control.

Experimento 2

Patrón cerebral basal de actividad o inmunoreactividad a Fra-Li en animales adultos programados y controles en los órganos circunventriculares de la lámina terminalis.

En lo que respecta al SFO, el análisis estadístico reveló que no hay diferencias significativas ($t_{2,44} = -0,87$; $p = 0,42$) en cuanto al número de neuronas crónicamente activadas en los animales provenientes del modelo MP-Na, con respecto al grupo MP-Control (Figura 9 A y B (A-B)).



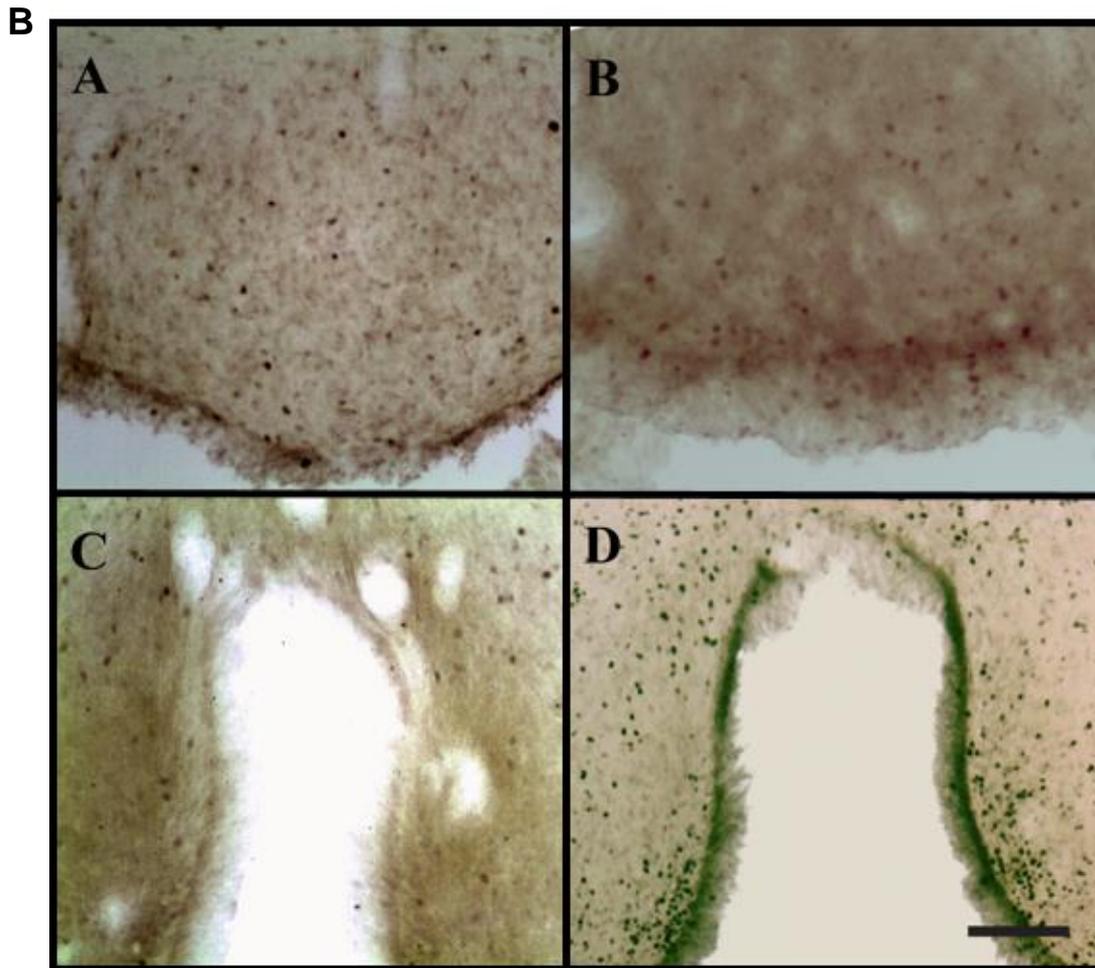


Figura 9. Patrón de inmunoreactividad a Fra-Li en los OCVs (A) Número de neuronas Fra-Li positivas en el SFO y OVLT, en animales MP-Control y MP-Na. Los valores se expresan como $M \pm EE$. (*) DS entre MP-Control vs. MP-Na, $p < 0,05$ **(B)** Fotomicrografías que muestran el patrón de inmunoreactividad a Fra-Li en el SFO (A-B) y en el OVLT (C-D) en animales del grupo MP-Control (A-C) y del grupo MP-Na (B-D). Las fotografías se muestran en una magnificación 10X. Barra de escala: 100 μ M.

Al analizar el OVLT, se observó una diferencia significativa ($t_{2,44} = -3,22$; $p = 0,02$) en el número de neuronas Fra-Li positivas de animales MP-Na, con respecto a los MP-Control (Figura 9 A y B (C-D)). Los animales pertenecientes al modelo MP-Na mostraron un mayor número de neuronas crónicamente activadas, en relación a los MP-Control (MP-Control: $105,5 \pm 21,85$ vs MP-Na: $308,5 \pm 59,01$).

Patrón cerebral basal de actividad o inmunoreactividad a Fra-Li y doble inmunoreactividad de Fra combinada con vasopresina (Fra-AVP) en animales adultos programados y controles en núcleos hipotalámicos.

En estos núcleos, se cuantificó el número de neuronas inmunoreactivas a Fra-Li, como así también el número de neuronas con inmunomarcación doble (Fra-AVP).

Núcleo supraóptico hipotalámico

La cuantificación del SON se realizó en dos secciones, una ubicada en posición anterior y otra posterior, de la correspondiente área (cuya distancia del bregma es -0.8 mm y -1.3mm respectivamente). No se observó en este núcleo una actividad neuronal (Fra-Li) significativamente diferente en los animales MP-Na, con respecto a MP-Control (Figura 10 A). Este patrón se mantuvo en ambas secciones del SON, la anterior y posterior ($t_{2,44} = -1,09$ y $p = 0,32$; $t_{2,57} = -0,39$ y $p = 0,72$; respectivamente).

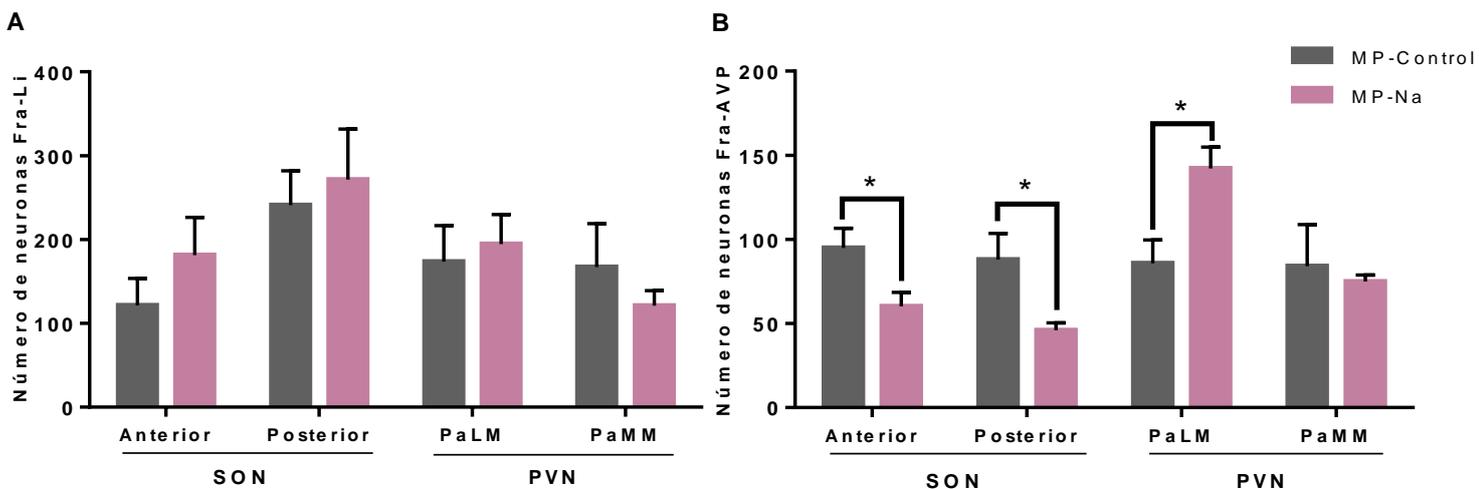


Figura 10. Inmunoreactividad a Fra-Li y Fra-AVP en el SON y PVN (A) Número de neuronas Fra-Li positivas (B) Número de neuronas Fra-AVP positivas, en el SON (en una sección anterior y en otra posterior) y en las subdivisiones magnocelulares del PVN: PaLM y PaMM, en animales MP-Control y MP-Na. Los valores se expresan como M±EE. (*) DS entre MP-Control vs. MP-Na, $p < 0,05$.

Al cuantificar el número de neuronas que además de estar activas (Fra-Li), mostraron un fenotipo vasopresinérgico (Fra-AVP positivas), se encontró un patrón de actividad de éstos núcleos disímil al mencionado anteriormente (Figura 10B y 11 A, B, C, D).

En los animales provenientes del modelo MP-Na se observó una disminución significativa del número de neuronas vasopresinérgicas crónicamente activadas, con respecto a los animales MP-Control, esto se pudo visualizar en la sección anterior y posterior correspondientes al núcleo supraóptico analizado ($t_{2,57} = 2,52$ y $p = 0,05$; $t_{2,57} = 2,99$ y $p = 0,03$, respectivamente). Obteniéndose los siguientes valores de $M \pm EE$ en el SON anterior, MP-Control: $95 \pm 11,59$ vs MP-Na: $60,25 \pm 8,3$ y en el SON posterior, MP-Control: $88 \pm 15,59$ vs MP-Na: $46 \pm 4,42$.

Por último, se cuantificó el número de neuronas totales positivas para AVP y se observó que tanto en el SON anterior como en el SON posterior, no hay diferencias significativas ($t_{2,57} = 1,33$ y $p = 0,24$; $t_{2,57} = 0,24$ y $p = 0,82$, respectivamente) en el número de neuronas vasopresinérgicas entre animales MP-Na y MP-Control

Núcleo paraventricular hipotalámico

Con respecto al núcleo paraventricular se analizaron las subdivisiones magnocelulares PaLM y PaMM. No se observó en estas áreas una actividad neuronal (Fra-Li) significativamente diferente entre los animales del grupo MP-Na con respecto a los del grupo MP-Control (Figura 10A), tanto en el PaLM como en el PaMM ($t_{2,44} = -0,38$ y $p = 0,72$; $t_{2,44} = 0,84$ y $p = 0,43$; respectivamente).

Además, se cuantificaron el número de neuronas vasopresinérgicas crónicamente activadas (neuronas Fra-AVP positivas) en las subdivisiones mencionados anteriormente (Figura 10B). Se encontró el mismo patrón que para Fra-Li en PaMM, es decir, no hay diferencias significativas en el número de neuronas vasopresinérgicas crónicamente activadas entre los animales MP-Na y MP-Control ($t_{2,44} = 0,36$; $p = 0,74$). En cambio, en el PaLM, como se muestra en la figura 11 E y F, se encontró que los animales del grupo MP-Na presentaban un aumento significativo del número de neuronas inmunoreactivas a Fra ($t_{2,44} = -3,01$; $p = 0,02$), que además presentaban un fenotipo vasopresinérgico, con respecto a los animales bajo un tratamiento MP-Control (MP-Control: $85,75 \pm 13,89$ vs MP-Na: $142,25 \pm 12,66$).

Además, se cuantificaron el número de neuronas AVP positivas totales y se observó que en el PaMM y PaLM, no hay diferencias significativas ($t_{2,44} = 2,62$ y $p = 0,08$; $t_{2,44} = 1,25$ y $p = 0,26$, respectivamente) en el número de neuronas AVP totales en animales pertenecientes al grupo MP-Na, con respecto al grupo MP-Control.

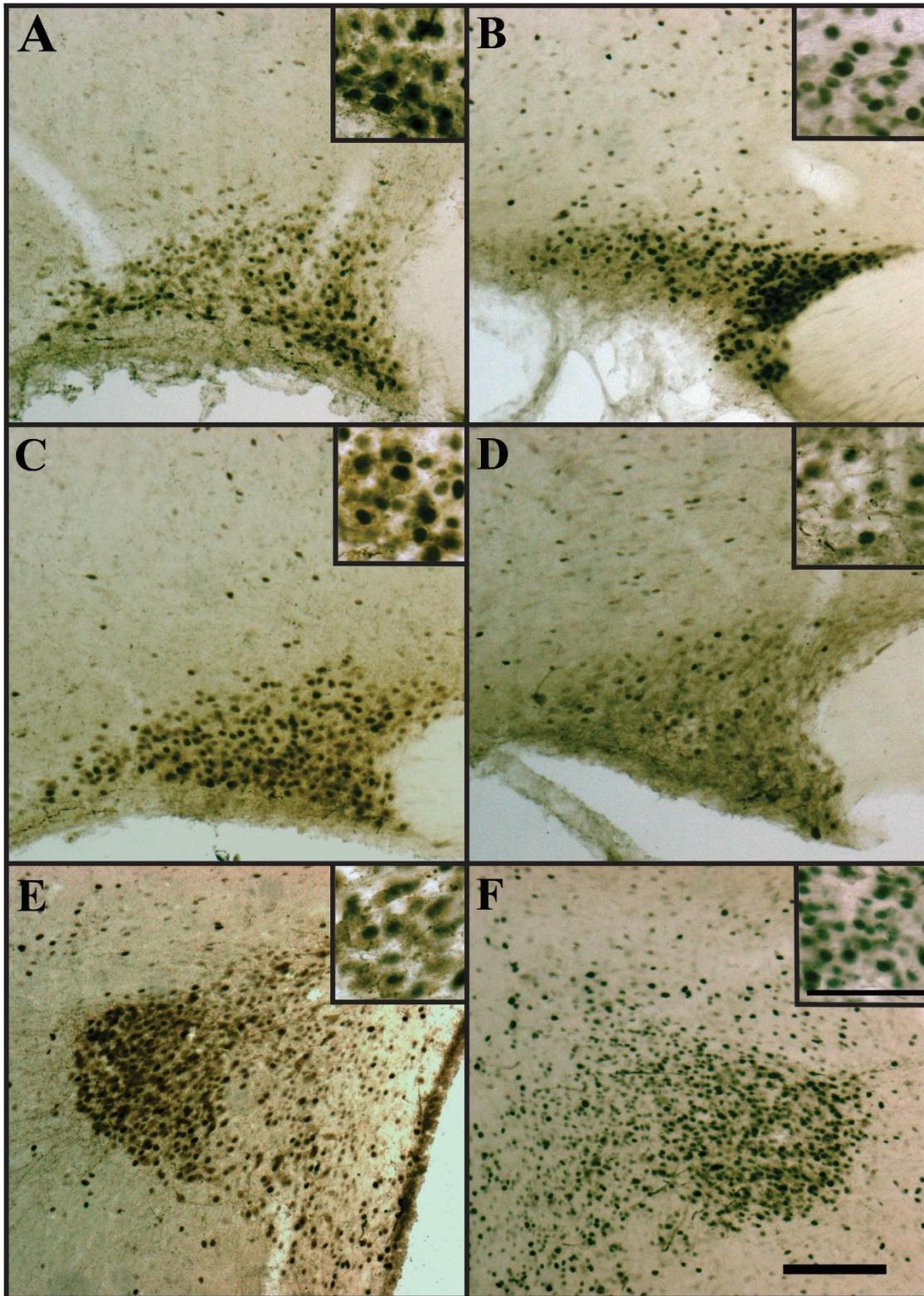


Figura 11. Fotomicrografías que muestran el patrón de inmunomarcación doble a Fra-AVP en el núcleo supraóptico (SON Anterior, A-B; SON posterior C-D) y en la subdivisión magnocelular lateral del núcleo paraventricular (PaLM, E-F), de animales pertenecientes al grupo MP-Control (A, C, E) y del grupo MP-Na (B, D, F). Las fotografías se muestran en una magnificación 10X, con una barra de escala= 100 μ M. En el extremo superior derecho de cada fotografía se muestra una magnificación mayor de las mismas (40X), con una barra de escala= 50 μ M.

Continuando con el análisis del núcleo paraventricular, también fue posible analizar la subdivisión parvocelular medial del PVN: PaMP.

En el PaMP no se observaron diferencias significativas ($t_{2,44} = -1,21$; $p = 0,27$) del número de neuronas crónicamente activadas entre los animales sometidos a un tratamiento de MP-Na y a un tratamiento MP-Control (Figura 14A).

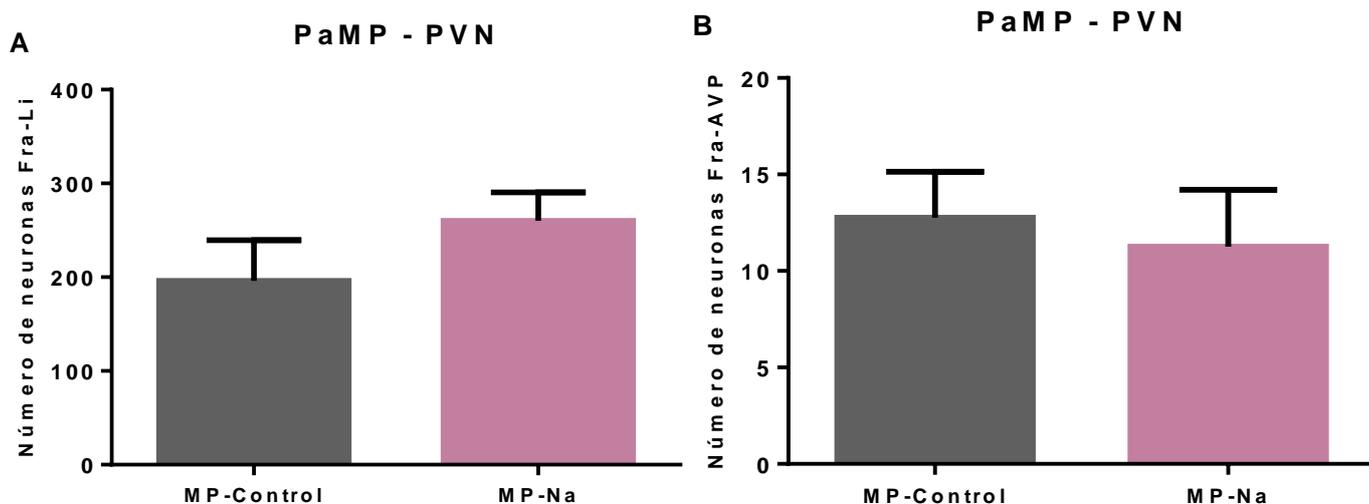


Figura 12. Inmunoreactividad a Fra-Li y Fra-AVP en PaMP (A) Número de neuronas Fra-Li positivas y **(B)** número de neuronas Fra-AVP positivas, en la subdivisión parvocelular del PVN: PaMP, en animales MP-Control y MP-Na. Los valores se expresan como $M \pm EE$.

Por último, se cuantificaron las neuronas vasopresinérgicas crónicamente activadas correspondientes a la subdivisión parvocelular medial del PVN (Figura 12 B). Al realizar el análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas en cuanto al número de células positivas para Fra y AVP, en animales MP-Na, con respecto a los animales del tratamiento MP-Control ($t_{2,44} = 0,39$; $p = 0,71$).

Experimento 3

Parámetros plasmáticos: análisis del efecto de la programación perinatal en la osmolaridad y en la concentración electrolítica.

A los fines de evaluar si el consumo voluntario de sodio materno es capaz de afectar la natremia y la osmolaridad basal en la descendencia adulta, determinamos en el plasma de las crías al día posnatal 60 la concentración de sodio, cloro y la osmolaridad. Como se puede observar en la tabla 1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en la concentración de sodio y cloro ($t=0,55$ y $p= 0,6$; $t=0,38$ y $p= 0,72$; respectivamente) así como tampoco en la osmolaridad del plasma ($t=2,06$; $p= 0,09$) de las crías sometidas a una programación perinatal, con respecto a las crías control.

Tabla 1. Valores correspondientes a los parámetros plasmáticos: $[Na^+]$, $[Cl^-]$ y osmolaridad, en animales pertenecientes a los grupos MP-Control y MP-Na.

Tratamiento	$[Na^+]$ mEq/l	$[Cl^-]$ mEq/l	Osmolaridad mOsm/kgH₂O
MP-Control	145,75 ± 1,31	92,75 ± 0,85	283,38 ± 3,97
MP-Na	144,25 ± 2,39	92,00 ± 1,78	271,75 ± 4,03

Valores expresados como $M \pm EE$ en animales MP-Control y MP-NA.

DISCUSIÓN

El presente trabajo permite profundizar el análisis acerca de los efectos del consumo materno voluntario de sodio en la descendencia adulta, aportando un posible sustrato del circuito osmosensor a nivel neuronal y molecular sobre el cual se modulen las alteraciones conductuales y endócrinas observadas ante desafíos osmóticos en trabajos anteriores (Macchione et al., 2012, 2015). En ese sentido este patrón de consumo materno produjo en la descendencia adulta un incremento en la actividad crónica del OVLT, una disminución de la actividad basal de las neuronas vasopresinérgicas a lo largo del SON y un incremento a lo largo de las células magnocelulares del PVN. Sin embargo, el consumo materno de sodio no afectó la expresión del TRPV1 en el SON y OVLT en los animales programados en relación a los controles.

Al analizar los parámetros plasmáticos en individuos adultos, en estado basal, sometidos a una manipulación temprana con NaCl hipertónico, no observamos diferencias con respecto a sus controles. Este resultado podría indicar que estas variables son mantenidas ya que existen múltiples mecanismos compensatorios para regular la osmolaridad debido a que es fundamental para la supervivencia de los seres vivos. Los animales osmoreguladores han desarrollado mecanismos que mantienen la osmolaridad del ECF cerca de un valor estable. Estos mecanismos involucran respuestas conductuales, autonómicas, renales y endócrinas fisiológicas que se oponen activamente a las perturbaciones osmóticas y sirven para restaurar la osmolaridad del ECF hacia un "punto de referencia" osmótico aparentemente fijo (Ganong, 2010). La regulación de la osmolaridad de los fluidos extracelulares es de gran importancia ya que los grandes cambios en la osmolaridad pueden causar síntomas neurológicos severos debido a los efectos de las concentraciones de electrolitos alteradas en la excitabilidad neuronal y el trauma físico que puede ser causado por tales condiciones (Bourque, 2008). En trabajos previos con el mismo modelo de MP, también se evaluaron los parámetros plasmáticos, en las madres y crías hembras al DPN21. Las crías del grupo MP-Na presentaron un aumento en la concentración de sodio plasmática y en la osmolaridad del plasma con respecto a las controles (Macchione et al., 2012). Posiblemente, el sistema de excreción renal no sea lo suficientemente eficiente y/o maduro en las crías para eliminar el sodio consumido en exceso (tanto el proveniente de las madres a través de la leche como el consumido directamente por ellas durante la última semana de lactancia), lo cual

resultaría en la acumulación de dicho electrolito en el organismo (Macchione et al., 2012 y 2015). Los animales adultos, con un sistema renal bien desarrollado y con la posibilidad de elección libre de agua y sodio, sean posiblemente capaces de realizar un coctel necesario para reestablecer el balance hidrosalino. Es decir, que la osmolaridad plasmática de la descendencia MP-Na adulta es normal y no representa un estímulo adicional en esta etapa del desarrollo donde analizamos a nivel cerebral la actividad de áreas osmosensoras y la expresión de TRPV1 basal, sin ningún tratamiento posnatal.

En el presente trabajo se utilizó la técnica de inmunohistoquímica para la detección de Fra-Li, un marcador sensible para la activación neuronal a largo plazo, en crías adultas expuestas prenatalmente a una solución hipertónica de NaCl, sin recibir una manipulación posterior. FRAs se han implicado en cambios fenotípicos a largo plazo después de estímulos crónicos, tónicos y repetidos o desinhibición neuronal (Kovács, 1998). El anticuerpo K-25, utilizado en este trabajo, reconoce a todas las proteínas de la familia Fos. Como consecuencia, la inmunoreactividad observada puede representar no solo un aumento en las proteínas Fra sino también un aumento en Fos o Fos-B. Sin embargo, Fos normalmente alcanza un pico máximo a partir de los 30 minutos a 1 hora, comienza a disminuir a las 2 horas y está esencialmente ausente a las 4 horas después de la introducción del estímulo. Con la estimulación continua, los niveles elevados de Fos disminuyen y permanecen en los valores basales. Fra aparece entre 1 y 3 h después del estímulo y puede persistir hasta más de 4 semanas (Vahid-Ansari & Leenen, 1998). En ese sentido, en estudios anteriores caracterizamos la marca de este anticuerpo (k-25) y de c-Fos (Ab-5, Oncogene Science, Manhasset, NY, USA) en animales basales y no se observa prácticamente marcación c-Fos y si para Fra-Li (Figura 6).

Nuestros resultados indican que los animales programados (MP-Na) tiene un patrón de activación alterada a lo largo del OVLT, considerado el osmosensor cerebral por excelencia. MP-Na presenta un aumento en la actividad crónica basal (Fra-Li) en relación a los controles. Esto podría indicar que los animales MP-Na presentan un patrón de activación basal incrementado como consecuencia de la MP en relación a los controles. En sintonía con estos datos, se ha descrito una vía monosináptica desde el OVLT al SON encargada de regular la liberación de AVP ante aumentos en la osmolaridad sistémica (Richard and Bourque, 1995, Bourque et al., 2008). Este aumento en la actividad basal posiblemente refleje una mayor actividad de las neuronas aferentes al SON con el fin de incrementar la actividad basal de AVP en el SON que se encuentra disminuida en los animales programados (Figura 10 B). Conjuntamente estos resultados demuestran que el

mecanismo de osmorecepción OVLT-SON-AVP ha sido alterado durante el consumo materno voluntario de sodio afectando las respuestas osmoregulatorias de las crías.

En nuestros trabajos anteriores (Macchione et al., 2012, 2015) observamos que los animales adultos descendientes de madres con consumo voluntario de solución hipertónica (MP-Na) muestran a nivel del SON un aumento en la actividad aguda evidenciada por inmunoreactividad c-Fos (utilizado en estímulos agudos) en las neuronas vasopresinérgicas ante una depleción de sodio (Macchione et al., 2012). Además, observamos previamente una disminución en la expresión del ARNm de AVP ante una sobrecarga de sodio corporal (Macchione et al., 2015). En el presente trabajo observamos una disminución en la actividad crónica basal (Fra-Li) de las neuronas AVP a nivel del SON en los animales del grupo MP-Na, el cual es considerado uno de los núcleos involucrados en el mantenimiento del balance hidrosalino, ocasionada por el consumo materno temprano voluntario de sodio, ya que estos no reciben ninguna manipulación posterior. Este patrón crónico diferencial podría explicar la mayor activación del sistema vasopresinérgico observada ante un desafío osmótico como un estado de hipovolemia inducido por depleción de sodio (Macchione et al., 2012). Es decir, se necesitaría una actividad aguda mayor para compensar la actividad basal deficiente y lograr una respuesta compensatoria a dicho desafío hipovolémico. Durante la depleción de sodio corporal los receptores de volumen/presión activan al sistema AVP para evitar la caída en la presión sanguínea arterial y aumentar la reabsorción de agua para restablecer la volemia (Stricker & Verbalis, 1986). Por el contrario, en trabajos previos, en un modelo de alteración del balance hidrosalino antagónico como la sobrecarga de sodio e hiperosmolaridad (estímulo por excelencia que activa al sistema AVP), observamos que no hay un aumento en el ARNm de AVP en comparación con el grupo control (MP-Control) y tampoco cambios en la actividad o ir-Fos de las neuronas vasopresinérgicas. Los presentes resultados muestran en concordancia, que hay una menor actividad crónica (Fra-Li) en esas neuronas, posiblemente implicada en la menor respuesta del ARNm de AVP ante el estímulo osmótico observada en los trabajos previos (Macchione et al., 2015). Este mismo patrón se ha visto en otros modelos de manipulación perinatal donde por ejemplo la exposición intrauterina a alcohol disminuye la síntesis y liberación de AVP ante estímulos osmóticos (Knee et al., 2004; Bird et al., 2006). Es decir que el sistema AVP es un sistema neuroplástico susceptible a los estímulos tempranos.

El consumo materno de sodio provocó también un aumento en la actividad crónica basal de las neuronas vasopresinérgicas a nivel de la subdivisión lateral magnocelular del

núcleo paraventricular (PaLM) en las crías adultas. Esta estructura, si bien también participa de la respuesta osmótica, recibe además numerosas aferencias de áreas de integración de orden superior que modulan respuestas de índole afectivas o emocional como la agresión, el estrés, cuidado de las crías, etc (Hernandez et al., 2016; Neumann & Landgraf, 2012; Paxinos, 2004). En coincidencia con este resultado, estudios previos de exposición intrauterina a dosis moderadas de alcohol han encontrado también un incremento en el número de neuronas vasopresinérgicas crónicamente activadas a nivel del PaLM (Godino et al., 2015). En este modelo de exposición prenatal a etanol se ha observado que los animales presentan, además, durante la adolescencia, preferencia por el alcohol y conductas ansiógenas en relación al grupo no programado (Godino et al., 2015, Wille-Bille et al., 2018). En estudios del grupo de Zhang y colaboradores (Hernandez et al., 2012, 2015, 2016), utilizando un modelo separación materna temprana, han observado que esta manipulación tiene relación directa tanto con una potenciación del sistema AVP hipotalámico, aumentando la actividad (c-Fos) y el RNAm de AVP en las neuronas vasopresinérgicas, como un incremento en las conductas ansiogénicas. Además, demostraron que las MNCs AVP tienen proyecciones extraneurohipofisarias hacia áreas involucradas en conductas sociales y afectivas tales como el hipocampo, habénula, amígdala central, y que muchas de estas proyecciones son fortalecidas en los individuos que han experimentado separación materna temprana. Es decir, que posiblemente esta mayor activación Fra-AVP en esta área (PaLM) sea parte de una respuesta compensatoria al estímulo temprano mediada por vías superiores, y que tenga implicancia en la alteración de otro tipo conductas; sin embargo se necesitarían experimentos que demuestren esta hipótesis.

Como se mencionó en el apartado de la introducción, es ampliamente conocido que el control osmótico de la secreción de AVP desempeña un papel clave en la osmoregulación sistémica debido a su capacidad para estimular la reabsorción de agua a nivel renal. Junto con los cambios adaptativos en la sed, los ajustes de retroalimentación en la secreción de AVP mediada por cambios en la osmolaridad del plasma proporcionan los mecanismos principales responsables de la osmoregulación sistémica en los mamíferos (Prager-Khoutorsky & Bourque., 2015). Se ha demostrado que las células del OVLT y las MNCs presentan una capacidad osmosensora intrínseca a través de canales catiónicos inactivados por estiramiento, el canal TRPV1 (Bourque, 1998; Voisin & Bourque, 2002; Bourque et al., 2002). Estas células se despolarizan e hiperpolarizan ante un aumento y disminución de la osmolaridad plasmática respectivamente modulando la liberación de

AVP. Estas evidencias junto con los presentes resultados podrían indicar que distintos eventos programadores ocurridos durante la etapa perinatal pueden alterar basalmente los mecanismos que subyacen a la regulación de la liberación de AVP afectando tanto directamente a las MNCs como indirectamente a través de las proyecciones monosinápticas que reciben del OVLT. Por ese motivo analizamos además la expresión génica del canal TRPV1 a nivel del SON y del OVLT por western blot, otro posible target del mecanismo osmosensor. Con respecto a este análisis, no se encontraron diferencias en el grupo MP-Na, con respecto al MP-Control. Como se mencionó anteriormente, TRPV1 interactúa con componentes del citoesqueleto como tubulina, esta última posee unos residuos de glutamato llamado gancho E, el cual se une a proteínas asociadas a microtubulos, tales como Maps, Tau, entre otras (Goswami et al., 2007). Además, por numerosos análisis tanto proteómicos como bioquímicos se pudo confirmar que el extremo C-terminal de TRPV1 (TRPV1-Ct) es suficiente para la interacción con tubulina, mientras que el extremo N-terminal de TRPV1 (TRPV1-Nt) aparentemente no interactúa (Goswami et al., 2004). TRPV1 preferiblemente interactúa a través de su dominio C-terminal con β -tubulina y en menor medida también con α -tubulina formando así un complejo de alto peso molecular. Además, diferentes modificaciones post-transduccionales, como tubulina tirosinada, tubulina detirosinada, tubulina acetilada, tubulina poliglutamilada, tubulina fosforilada interactúan con el extremo C terminal de TRPV1 (Goswami et al., 2007). A partir de los resultados obtenidos y de los antecedentes mencionados, al no encontrar un efecto de la programación perinatal sobre la expresión del canal, procederemos a evaluar si ésta genera algún cambio en las interacciones del canal. Esto sugiere un posible blanco de estudio para evaluar si la programación perinatal, inducida por el consumo materno voluntario de sodio hipertónico, tiene algún efecto en la interacción entre TRPV1-tubulina y si la misma ejerce modificaciones post-transduccionales en la tubulina que comprometa o refuerce la unión con el extremo C terminal de TRPV1.

Finalmente, los resultados dan evidencias de los efectos programadores que puede tener el consumo de sodio hipertónico, por parte de las madres durante el periodo de gestación y lactancia, en las crías adultas. Este modelo de MP deja una impronta en los sistemas en desarrollo, aun cuando el estímulo programador ha cesado. Es decir, que esta impronta es capaz de persistir a largo plazo y, si bien no produce alguna patología evidente en los animales, sí podría favorecer o predisponer a estos individuos a desarrollar alguna de ellas. Basándonos en la idea de que los mecanismos conductuales y fisiológicos tienen un

punto fisiológico de ajuste, a partir del cual se ponen en funcionamiento, postulamos que un ambiente perinatal modificado, con características propias, puede afectar los sistemas del organismo en desarrollo a través de un proceso neuroadaptativo.

Nuestro trabajo responde parte del interrogante planteado inicialmente, “si el mecanismo osmosensor está basalmente alterado por los efectos de la programación perinatal” demostrando que: -Existen cambios en la actividad celular tónica a nivel del OVLT y neuronas AVP hipotalámicas. -No hay cambios en la expresión génica del canal osmosensor TRPV1 en el OVLT y SON. En suma, el mecanismo osmosensor central es un sistema plástico susceptible a estímulos tempranos durante la ontogenia, alterando crónicamente al individuo y su capacidad de respuesta ante desafíos homeostáticos.

Estos datos también abren paso a nuevos interrogantes que deseamos abordar a futuro sobre los efectos programadores del consumo materno voluntario de NaCl hipertónico: si afecta la interacción entre TRPV1 y el citoesqueleto, y si hay cambios de tipo epigenéticos (metilaciones o acetilaciones) en el promotor de AVP, ya que el sistema AVP se encuentra alterado, no solo en nuestro modelo de programación perinatal, sino también en muchos otros (Greenwood et al., 2016), siendo un blanco de los estímulos tempranos.

En suma, esta exposición temprana o perinatal a NaCl hipertónico produce cambios crónicos en el circuito osmosensor (OVLT-SON-PVN) alterando las respuestas ingestivas y endocrinas observadas previamente ante desafíos osmóticos (Figura 13).

A

Los animales programados en relación a los controles presentan la siguientes alteraciones en las áreas osmosensoras:			
ESTADO FISIOLÓGICO	OVLT	SON	PaLM
BASAL (B)	Aumenta actividad crónica de células (Fra-LI) No hay cambios en la expresión de TRPV1	Disminuye actividad crónica en neuronas AVP (Fra-AVP) No hay cambios en la expresión de TRPV1	Aumenta la actividad crónica en neuronas AVP (Fra-AVP)
DESAFÍO OSMÓTICO	DEPLECIÓN DE SODIO (DS) (Macchione et al., 2012)	No hay cambios en la actividad celular (Ir-Fos)	Aumenta la actividad de neuronas AVP (Fos-AVP)
	SOBRECARGA DE SODIO (SS) (Macchione et al., 2015)	No hay cambios en la actividad celular (Ir-Fos)	<ul style="list-style-type: none"> • No cambia la actividad de neuronas AVP (Fos-AVP) • No aumenta RNAm de AVP
			No cambia la actividad de neuronas AVP (Fos-AVP)
			Fos-AVP no cambia

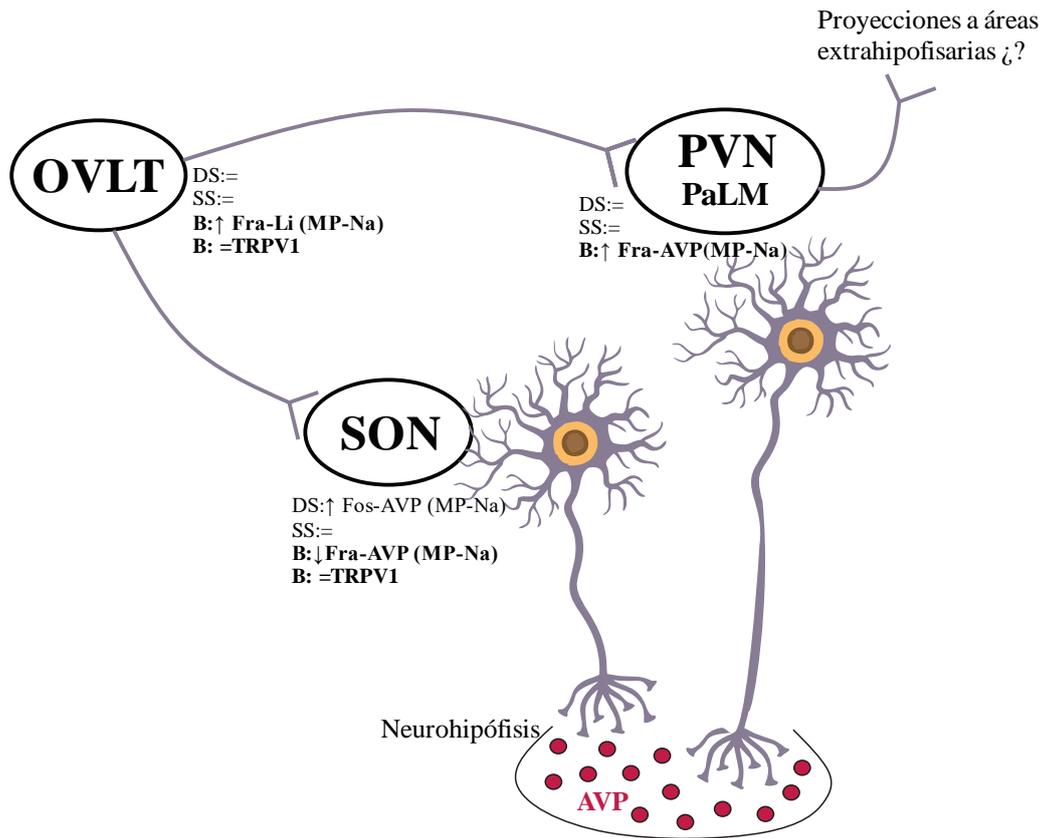
B

Figura 13. Esquema del patrón de actividad celular observado en el modelo de MP de consumo voluntario de sodio hipertónico (A) Tabla que resume las evidencias obtenidas en el presente trabajo y en los trabajos anteriores del laboratorio con el modelo de programación perinatal (B) Se compara la MP en dos desafíos osmótico, DS: depleción de sodio y SS: sobrecarga de sodio (ambas evidenciadas por Fos-ir), con la situación B: basal (evidenciada por Fra-Li). En cada núcleo se representa los cambios de los animales MP-Na en relación a los MP-Control de la siguiente forma, =: no hay cambios, ↑: cuando hay un aumento de MP-Na con respecto al MP-Control, ↓: cuando hay una disminución de MP-Na con respecto a MP-Control. Las neuronas que proyectan del SON y PVN a la neurohipófisis simbolizan a las células neurosecretoras magnocelulares liberadoras de AVP.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias al apoyo del subsidio "**Proyecto de Unidades Ejecutoras de CONICET**" (PUE). Título: "Estudio de los mecanismos de plasticidad neuronal en el sistema nervioso joven y adulto: implicancias para el desarrollo de patologías neuropsiquiátricas y degenerativas". (RD 1691/16) Director: Alfredo Cáceres.

Agradecemos especialmente al Doctor Agustin Anastasia quien ha facilitado a nivel teórico y metodológico el desarrollo de este trabajo.

BIBLIOGRAFIA

- Argüelles J, Brime JI, López-Sela P, Perillán C, Vijande M (2000). Adult offspring long-term effects of high salt and water intake during pregnancy. *Hormones and Behavior* 37:156–162.
- Barker DJ (1992). The fetal origins of adult hypertension. *J Hypertens Suppl* 10(7):S39-44.
- Barker DJ, Hales CN, Fall CH, Osmond C, Phipps K, Clark PM (1993). Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 36(1):62-7.
- Barker DJ, Osmond C, Simmonds SJ, Wield GA (1993). The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *BMJ* 306(6875):422-6.
- Barker DJ, Winter PD, Osmond C, Margetts B, Simmonds SJ (1989). Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. *Lancet* 2(8663):577-80.
- Bourque CW (1998). Osmoregulation of vasopressin neurons: a synergy of intrinsic and synaptic processes. *Prog Brain Res* 119:59-76.
- Bourque CW (2008). Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nature Reviews Neuroscience* 9(7):519.
- Bourque CW, Voisin DL, Chakfe Y (2002). Stretch-inactivated cation channels: cellular targets for modulation of osmosensitivity in supraoptic neurons. *Prog Brain Res* 139:85-94.
- Butler DG, Pak SH, Midgely A, Nemati B (2002). AT (1) receptor blockade with losartan during gestation in Wistar rats leads to an increase in thirst and sodium appetite in their adult female offspring. *Regul Pept* 105(1):47-57.
- Chadwick MA, Vercoe PE, Williams IH, Revell DK (2009). *Physiol Behav*; 22; 97(3-4):437-45.
- Ciura S, Bourque CW, Liedtke W (2011). Hypertonicity Sensing in Organum Vasculosum Lamina Terminalis Neurons: A Mechanical Process Involving TRPV1 But Not TRPV4. *The Journal of Neuroscience* 31(41):14669 –14676.
- Clapham DE. (2003) TRP channels as cellular sensors. *Nature* 426:517-524.
- Conde C, Caceres A (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. *Nature reviews. Neuroscience* 10: 319-32
- Contreras RJ, Kosten T (1983). Prenatal and early postnatal sodium chloride intake modifies the solution preferences of adult rats. *J Nutr* 113(5):1051-62
- Contreras RJ, Ryan KW (1990). *Physiology & behavior* 47: 507-12
- Crystal SR, Bernstein IL (1995). Morning sickness: impact on offspring salt preference. *Appetite* 25: 231-40
- Curtis KS, Krause EG, Wong DL, Contreras RJ (2004). Gestational and early postnatal dietary NaCl levels affect NaCl intake, but not stimulated water intake, by adult rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(6):R1043-50.
- Dabelea D, Pettitt DJ (2001). Intrauterine diabetic environment confers risks for type 2 diabetes mellitus and obesity in the offspring, in addition to genetic susceptibility. *J Pediatr Endocrinol Metab* 14:1085-1091.
- de Boo HA, Harding JE (2006). The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. *The Australian & New Zealand journal of obstetrics & gynaecology* 46: 4-14.
- Desai M, Guerra C, Wang S, Ross MG (2003). Programming of hypertonicity in neonatal lambs: resetting of the threshold for vasopressin secretion. *Endocrinology* 144(10):4332-7.

- Eriksson JG, Forsen T, Tuomilehto J, Osmond C, Barker DJ (2003). Early adiposity rebound in childhood and risk of Type 2 diabetes in adult life. *Diabetologia* 46:190-194.
- Frankel S, Elwood P, Sweetnam P, Yarnell J, Smith GD (1996). Birthweight, body-mass index in middle age, and incident coronary heart disease. *Lancet* 348 (9040):1478-80.
- functional map. *Neurochem Int* 33 287:297.
- Galaverna O, Nicolaïdis S, Yao SZ, Sakai RR, Epstein NA (1995). Endocrine consequences of prenatal sodium depletion prepare rats for high need-free NaCl intake in adulthood. *Am J Physiol* 269(3 Pt 2):R578-83.
- Ganong W (2010). Fisiología médica. 23 Edición. McGraw Hill Mexico (Capítulo 39).
- Geraldo S, Khanzada UK, Parsons M, Chilton J & Gordon-Weeks P (2008). Targeting of the F-actin-binding protein drebrin by the microtubule plus-tip protein EB3 is required for neuritogenesis. *Nature Cell Biol* 10:1181–1189.
- Gluckman P, Hanson M (2005). The Foetal Matrix: Evolution, Development and Disease. Cambridge: Cambridge University Press.
- Godino A, Abate P, Amigone JL, Vivas L, Molina JC (2015). Prenatal binge-like alcohol exposure alters brain and systemic responses to reach sodium and water balance. *Neuroscience* 311:92–104.
- Goswami C, Dreger M, Jahnel R, Bogen O, Gillen C, Hucho F (2004). Identification and characterization of a Ca²⁺-sensitive interaction of the vanilloid receptor TRPV1 with tubulin. *J Neurochem* 91:1092–1103.
- Goswami C, Hucho T (2008). Submembraneous microtubule cytoskeleton: biochemical and functional interplay of TRP channels with the cytoskeleton. *The FEBS Journal* 275: 4684–4699.
- Goswami C, Hucho TB, Hucho F (2007). Identification and characterisation of novel tubulin-binding motifs located within the C-terminus of TRPV1. *J Neurochem* 101:250–262.
- Greenwood MP, Greenwood M, Gillard BT, Loh SY, Paton JF, Murphy D. (2016) Epigenetic Control of the Vasopressin Promoter Explains Physiological Ability to Regulate Vasopressin Transcription in Dehydration and Salt Loading States in the Rat. *J Neuroendocrinol.* Apr;28(4). doi: 10.1111/jne.12371.
- Hernández V, Vázquez-Juárez E, Márquez MM, Jáuregui-Huerta JH, Barrio R, Zhang L (2015). Extra-neurohypophyseal axonal projections from individual vasopressin-containing magnocellular neurons in rat hypothalamus. *Front. Neuroanat.* 9:130
- Hernández VS & Zhang L (2012). “Vasopressin containing fibers distribution and synaptic innervation in the medial and central amygdala: an immunohistochemical study using light and electron microscopy” in Work Presented at SFN Annual Meeting, (New Orleans, LA).
- Hernández VS, Hernández OR, Perez de la Mora M, Gómora MJ, Fuxe K, Eiden LE, Zhang L (2016). Hypothalamic Vasopressinergic Projections Innervate Central Amygdala GABAergic Neurons: Implications for Anxiety and Stress Coping.
- Huxley RR, Shiell AW, Law CM (2000). The role of size at birth and postnatal catch-up growth in determining systolic blood pressure: a systematic review of the literature. *J Hypertens* 18(7):815-31.
- Hypponen E, Leon DA, Kenward MG, Lithell H (2001). Prenatal growth and risk of occlusive and haemorrhagic stroke in Swedish men and women born 1915–29:

- historical cohort study. *Br Med J* 323:1033-1034.
- Immke DC & Gavva NR (2006). The TRPV1 receptor and nociception. *In Seminars in cell & developmental biology* 17(5):582-591.
 - Jacek J, Kapitein LC, Montenegro Gouveia S, Dortland BR, Wulf PS, Grigoriev I, Camera P, Spangler SA, Di Stefano P, Demmers J, Krugers H, Defilippi P, Akhmanova A, Hoogenraad CC (2009). Dynamic microtubules regulate spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* 61: 85–100.
 - Khan IY, Taylor PD, Dekou V, Seed PT, Lakasing L, Graham D, Dominiczak AF, Hanson MA, Poston L (2003). Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats. *Hypertension* 41:168-175.
 - Koning JFR & Klippel RA (1963). The rat brain. A stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
 - Kovács KJ (1998). c-Fos as a transcription factor: a stressful (re)view from a
 - Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, Seckl JR (1996). Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta* 17(2-3):169-72.
 - Leshem M (2009). Biobehavior of the human love of salt. *Neurosci Biobehav Rev* 33(1):1-17.
 - Lucas A (1991). Programming by early nutrition in man. In: Bock GR, Whelan J, editors. *The childhood environment and adult disease*. Chichester: Wiley pp 38–55.
 - Macchione AF, Beas C, Dadam FM, Caeiro XE, Godino A, Ponce L, Amigone JL and Vivas L (2015). Early free access to hypertonic nacl solution induces a long-term effect on drinking, brain cell activity and gene expression of adult rat offspring. *Neuroscience* 298: 120-136.
 - Macchione AF, Caeiro XE, Godino A, Amigone JL, Antunes-Rodrigues J, Vivas L (2012). Availability of a rich source of sodium during the perinatal period programs the fluid balance restoration pattern in adult offspring. *Physiology & behavior* 105: 1035-1044.
 - Margatho LO, Porcari CY, Macchione AF, Silva Souza GD, Caeiro XE, Antunes-Rodrigues J, Vivas L, Godino A (2015). Temporal dissociation between sodium depletion and sodium appetite appearance: involvement of inhibitory and stimulatory signals. *Neuroscience* 297:78-88.
 - Matsuda T, Hiyama TY, Niimura F, Matsusaka T, Fukamizu A, Kobayashi K, Kobayashi K, Noda M (2017). Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. *Nat Neurosci*. 20(2):230-241.
 - McKinley MJ, McAllen RM, Davern PJ, Giles ME, Penschow J, Sunn N, Uschakov A, Oldfield, B. (2003). The sensory circumventricular organs of the mammalian brain: subfornical organ, OVLT and area postrema (Vol. 172). Springer Science & Business Media.
 - Mecawi A, Macchione AF, Nunez P, Perillan C, Reis LC, Vivas L, Arguelles J (2015). Developmental programming of thirst and sodium appetite. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 51:1–14.
 - Mecawi AS, Araujo IG, Rocha FF, Coimbra TM, Antunes-Rodrigues J, Reis LC (2010). Ontogenetic role of angiotensin-converting enzyme in rats: thirst and sodium appetite evaluation. *Physiol Behav* 99(1):118-24.

- Mouw DR, Vander AJ, Wagner J (1978). Effects of prenatal and early postnatal sodium deprivation on subsequent adult thirst and salt preference in rats. *Am J Physiol* 234(1):F59-63.
- Mucio-Ramírez S, Sánchez-Islas E, Sánchez-Jaramillo E, Currás-Collazo M, Juárez-González VR, Álvarez-González MY, Orser LE, Hou B, Pellicer F, Kodavanti PRS, León-Olea M (2017). Perinatal exposure to organohalogen pollutants decreases vasopressin content and its mRNA expression in magnocellular neuroendocrine cells activated by osmotic stress in adult rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 15(329):173-189.
- Naeini RS, Witty MF, Séguéla P, Bourque CW (2006). An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. *Nature neuroscience* 9(1), 93.
- Neumann I & Landgraf R (2012). Balance of brain oxytocin and vasopressin: implications for anxiety, depression, and social behaviors. *Trends in Neurosciences* 35(11): 649-659.
- Oliet SH & Bourque CW (1993). Steady-state osmotic modulation of cationic conductance in neurons of rat supraoptic nucleus. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 265(6): R1475-R1479.
- Osmond C, Barker DJ, Winter PD, Fall CH, Simmonds SJ (1993). Early growth and death from cardiovascular disease in women. *BMJ* 307(6918):1519-24.
- Paxinos G, Watson C (1997). The rat brain in stereotaxic coordinates, 2nd edicion, New York: Academic Press.
- Paxinos, G (2004). The rat nervous system. Academic press. Tercera edición.
- Prager-Khoutorsky M, Bourque CW (2015). Mechanical basis of osmosensory transduction in magnocellular neurosecretory neurones of the rat supraoptic nucleus. *Journal of neuroendocrinology* 27: 507-15
- Prager-Khoutorsky M, Khoutorsky A, Bourque CW (2014). Unique interweaved microtubule scaffold mediates osmosensory transduction via physical interaction with TRPV1. *Neuron* 83: 866-78.
- Ramirez BA, Wang S, Kallichanda N, Ross MG (2002). Chronic in utero plasma hyperosmolality alters hypothalamic arginine vasopressin synthesis and pituitary arginine vasopressin content in newborn lambs. *Am J Obstet Gynecol* 187(1):191-6.
- Ravelli AC, van Der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP (1999). Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally. *Am J Clin Nutr* 70:811-816.
- Rich-Edwards JW, Kleinman K, Michels KB, Stampfer MJ, Manson JE, Rexrode KM, Hibert EN, Willett WC (2005). Longitudinal study of birth weight and adult body mass index in predicting risk of coronary heart disease and stroke in women. *Br Med J* 330(7500):1115.
- Ross MG, Desai M, Guerra C, Wang S (2005). Prenatal programming of hypernatremia and hypertension in neonatal lambs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288(1):R97-103.
- Rowland NE, Crews EC, Young SL, Speth RC (1999). Dietary NaCl during pregnancy and lactation: effect on brain angiotensin II receptors and behavior. *Behav Neurosci* 113(5):1090-4.
- Sharif Naeini R, Witty M F, Séguéla P and Bourque, CW (2006). An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. *Nature Neuroscience* 9 (1): 93–98.

- Sobngwi E, Boudou P, Mauvais-Jarvis F, Leblanc H, Velho G, Vexiau P, Porcher R, Hadjadj S, Pratley R, Tataranni PA, Calvo F, Gautier JF (2003). Effect of a diabetic environment in utero on predisposition to type 2 diabetes. *Lancet* 361:1861–1865.
- Stricker EM & Verbalis JG (1986). Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 250(2):R267-R275.
- Vahid-Ansari F & Leenen FH (1998). Pattern of neuronal activation in rats with CHF after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275:H2140-H2146.
- Vijande M, Brime JI, López-Sela P, Costales M, Arguelles J (1996). Increased salt preference in adult offspring raised by mother rats consuming excessive amounts of salt and water. *Regul. Pept* 66:105–108.
- Vivas L, Chiaraviglio E, Carrer HF (1990). Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: responses to changes in sodium concentration. *Brain research* 519(1-2):294-300.
- Voisin DL, Bourque CW (2002). Integration of sodium and osmosensory signals in vasopressin neurons. *Trends Neurosci* 25:199-205.
- Whitnall MH, Key S, Ben-Barak Y, Ozato K, Gainer H (1985). Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system. II. Immunocytochemical studies of the ontogeny of oxytocinergic and vasopressinergic neurons. *J Neurosci* 5:98-109.
- Wille-Bille A., Miranda Morales RS, Pucci M, Bellia F, D'addario C, Pautassi RM (2018). Prenatal ethanol induces an anxiety phenotype and alters expression of dynorphin & nociceptin/orphanin FQ genes. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 85:77-88.
- Woodall SM, Johnston BM, Breier BH, Gluckman P (1996). Chronic maternal undernutrition in the rat leads to delayed postnatal growth and elevated blood pressure of offspring. *Pediatr Res* 40(3):438-43.
- Yang Y, Xin Z, Chu J, Li N, Sun T (2015). Involvement of Caveolin-1 in CD83 Internalization in Mouse Dendritic Cells. *Cell Transplant* 24 (7):1395-404.