

## Efeitos Sexo-Específicos de Estresse Pré-Natal na Expressão Região-Específica de Monoamina Oxidase A e Receptores Adrenérgicos B no Coração de Ratos

*Sex-Related Effects of Prenatal Stress on Region-Specific Expression of Monoamine Oxidase A and  $\beta$  Adrenergic Receptors in Rat Hearts*

Tanja Jevdjovic,<sup>1</sup> Tamara Dakic,<sup>1</sup> Sonja Kopanja,<sup>2</sup> Iva Lakic,<sup>1</sup> Predrag Vujovic,<sup>1</sup> Nebojsa Jasic,<sup>1</sup> Jelena Djordjevic<sup>1</sup>

Faculty of Biology - University of Belgrade,<sup>1</sup> Belgrado - Sérvia

Department of Pediatrics and Adolescent Medicine - Medical University of Vienna,<sup>2</sup> Viena – Áustria

### Resumo

**Fundamento:** Estresse pré-natal pode aumentar os riscos de desenvolver doenças cardiovasculares na idade adulta. Os efeitos cardiotoxícos de catecolaminas são mediados pela estimulação prolongada dos receptores adrenérgicos e pelo aumento do estresse oxidativo após sua degradação pela monoamina oxidase A (MAO-A).

**Objetivos:** Investigamos os efeitos a longo prazo de estresse pré-natal nos receptores  $\beta$  (1, 2, 3) adrenérgicos e na expressão do gene MAO-A nos corações da prole adulta de ratos.

**Método:** Ratas prenhes foram expostas a estresse crônico moderado imprevisível durante a terceira semana de gestação. O RNA foi isolado do ápice e da base do ventrículo esquerdo da prole adulta. Utilizou-se PCR quantitativa em tempo real para medir a expressão gênica nas amostras de tecido ventricular coletadas. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

**Resultados:** Foi indetectável o mRNA do receptor adrenérgico  $\beta_3$  no ventrículo esquerdo dos ratos. O receptor adrenérgico  $\beta_1$  foi o subtipo mais expresso no miocárdio ventricular esquerdo apical e basal nas fêmeas controle. A prole masculina das mães não estressadas apresentou níveis cardíacos apicais de mRNA do receptor adrenérgico  $\beta_1$  mais altos do que os de  $\beta_2$ . Porém, mRNAs dos receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  foram expressos de forma semelhante no miocárdio basal ventricular na prole masculina em geral. Ao contrário da prole masculina, a prole feminina exposta ao estresse pré-natal exibiu uma expressão diminuída do mRNA do receptor adrenérgico  $\beta_1$  no miocárdio apical. O estresse pré-natal não afetou a expressão gênica de MAO-A cardíaca.

**Conclusões:** Coletivamente, nossos resultados mostram que estresse pré-natal pode ter exercido padrões de expressão região- e sexo-específica dos receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$  no ventrículo esquerdo. (Arq Bras Cardiol. 2019; 112(1):67-75)

**Palavras-chave:** Gravidez; Estresse Fisiológico; Estresse Oxidativo; Coração; Catecolaminas; Ratos; Sexo; Feminino; Cardiotoxicidade; Antagonistas dos Receptores B1 B2.

### Abstract

**Background:** Prenatal stress may increase risk of developing cardiovascular disorders in adulthood. The cardiotoxic effects of catecholamines are mediated via prolonged adrenergic receptor stimulation and increased oxidative stress upon their degradation by monoamine oxidase A (MAO-A).

**Objectives:** We investigated long-term effects of prenatal stress on  $\beta$  (1, 2, 3) adrenergic receptors and MAO-A gene expression in the hearts of adult rat offspring.

**Methods:** Pregnant rats were exposed to unpredictable mild stress during the third week of gestation. RNA was isolated from left ventricular apex and base of adult offspring. Quantitative PCR was used to measure gene expression in collected ventricular tissue samples. The level of significance was set to  $p < 0.05$ .

**Results:**  $\beta_3$  adrenergic receptor mRNA was undetectable in rat left ventricle.  $\beta_1$  adrenergic receptor was the predominantly expressed subtype at the apical and basal left ventricular myocardium in the control females. Male offspring from unstressed mothers displayed higher apical cardiac  $\beta_1$  than  $\beta_2$  adrenergic receptor mRNA levels. However,  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptor mRNAs were similarly expressed at the ventricular basal myocardium in males. Unlike males, prenatally stressed females exhibited decreased  $\beta_1$  adrenergic receptor mRNA expression at the apical myocardium. Prenatal stress did not affect cardiac MAO-A gene expression.

**Conclusions:** Collectively, our results show that prenatal stress may have exerted region- and sex-specific  $\beta_1$  and  $\beta_2$  adrenergic receptor expression patterns within the left ventricle. (Arq Bras Cardiol. 2019; 112(1):67-75)

**Keywords:** Pregnancy; Stress, Physiological; Oxidative Stress; Heart; Catecholamines; Rats; Sex; Female; Cardiotoxicity; Adrenergic beta1 beta2 Receptor Antagonists.

Full texts in English - <http://www.arquivosonline.com.br>

Correspondência: Tanja Jevdjovic •

Studentski trg 16, 11000, Belgrado – Sérvia

E-mail: [tanja.jevdjovic@bio.bg.ac.rs](mailto:tanja.jevdjovic@bio.bg.ac.rs), [tanja.jevdjovic@gmail.com](mailto:tanja.jevdjovic@gmail.com)

Artigo recebido em 01/02/2018, revisado em 14/06/2018, aceito em 23/07/2018

DOI: 10.5935/abc.20190001

## Introdução

Dados recentes de estudos epidemiológicos e experimentais apontam que distúrbios no ambiente intrauterino estão relacionados ao aumento do risco de desenvolver patologias mais tarde na vida. Observou-se um aumento na suscetibilidade à hipertensão adulta em prole prenatalmente exposta a nutrição materna desequilibrada,<sup>1-3</sup> glicocorticóides sintéticos,<sup>4</sup> ou estresse materno.<sup>5</sup> Reconhece-se há muito tempo que exposição a estresse pré-natal resulta em aumento na atividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema nervoso simpático (SNS) na idade adulta.<sup>6,7</sup>

Atividade desregulada do SNS é uma característica marcante de distúrbios cardiovasculares. Portanto, não é surpreendente que os principais alvos farmacêuticos no manejo desses distúrbios sejam principalmente moduladores da atividade dos receptores adrenérgicos. Os efeitos cardiotoxicos das catecolaminas são mediados principalmente por superestimulação persistente ou aguda dos receptores adrenérgicos  $\beta$  (ADRB).<sup>8</sup> São presentes três subtipos de ADRB no coração humano saudável, sendo o ADRB1 o mais comum e ADRB3 o menos.<sup>9,10</sup> Na subpopulação ADRB1, a regulação negativa é uma das características moleculares das patologias cardíacas, como a insuficiência cardíaca humana.<sup>9,11</sup> Além disso, estudos com animais transgênicos demonstram que os efeitos iniciais da superexpressão do ADRB2 levam ao aumento da contratilidade cardíaca.<sup>12</sup> Porém, mais tarde na vida esses animais transgênicos desenvolveram disfunção ventricular.<sup>13</sup> Além disso, outra condição patológica miocárdica desencadeada por catecolaminas circulantes elevadas é definida por uma disfunção contrátil específica da região, principalmente apical, dentro do ventrículo esquerdo.<sup>14</sup>

Adicionalmente, a cardiotoxicidade pode resultar da produção de espécies reativas do oxigênio (ROS) na degradação de catecolaminas pela monoamina oxidase A (MAO-A) no coração.<sup>15</sup> Aumenta-se a expressão e atividade de MAO-A cardíaca em vários modelos animais de insuficiência cardíaca<sup>16-18</sup> e envelhecimento.<sup>19</sup> Estudos epidemiológicos mostram que pacientes femininos e masculinos de doença cardiovascular apresentam respostas diferenciais a diversos tratamentos recomendados.<sup>20,21</sup> Este fato enfatiza a necessidade de incluir os dois sexos em pesquisa cardiovascular.

Para entender melhor os mecanismos moleculares pelos quais o estresse pré-natal pode contribuir ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares na vida adulta, o presente estudo foi desenvolvido para investigar a expressão gênica região-específica dos subtipos de receptores adrenérgicos (ADRB1, ADRB2 e ADRB3) e do MAO-A no miocárdio ventricular esquerdo de prole feminina e masculina.

## Métodos

### Animais

Ratas Wistar virgens ( $266 \pm 11,9$  g), com três meses de idade, foram alojadas no biotério da Faculdade de Biologia da Universidade de Belgrado, com livre acesso a alimento e água, sob ciclo claro-escuro constante (12/12 h) em condições de temperatura controladas ( $22 \pm 1^\circ\text{C}$ ). O tamanho da amostra

foi determinado por conveniência. Cada um dos seis pares de ratas foi enjaulado com um rato macho sexualmente experiente durante o ciclo do estro. Indicou-se o dia 0 da gestação com o aparecimento de espermatozoides no esfregaço vaginal. Uma rata não emprenhou-se. Para evitar viés de seleção, as fêmeas prenhes que acasalaram com o mesmo macho foram aleatoriamente designadas para o grupo controle ( $n = 5$ ) ou estressado ( $n = 6$ ) e alojadas individualmente. Conduziram-se todos os procedimentos de acordo com as normas de cuidados com animais propostos pela Federação Europeia das Associações de Ciência em Animais de Laboratório (FELASA) e aprovados pelo Comitê de Ética da Faculdade de Biologia da Universidade de Belgrado.

### Protocolo de estresse pré-natal

Durante a terceira semana da gestação (dia gestacional 13-20, GD13-GD20), as ratas prenhes foram expostas a um protocolo de estresse crônico moderado imprevisível (ECMI) que incluiu exposição aleatória e intermitente a uma variedade de estressores. O protocolo detalhado do ECMI é mostrado na Tabela 1. Resumidamente, os animais foram expostos aos seguintes estressores em ordem aleatória duas vezes ao dia durante 1 h ou durante a noite: cama úmida, contenção dentro de um tubo de Plexiglas®, ambiente frio ( $4^\circ\text{C}$ ), deslocamento da gaiola e barulho, iluminação durante a noite e inclinação da gaiola. Mães de controle não foram perturbadas durante a gestação, com exceção do manejo geral. Durante toda a gestação, a ingestão de água e alimentos foi registrada.

### Exames bioquímicos

Antes da primeira e depois da última exposição aos estressores, coletou-se o sangue na veia caudal das ratas prenhes em tubos com EDTA. Os níveis plasmáticos do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) foram medidos com CLIA e os níveis de glicose foram medidos com um analisador de glicose Exac-tech com tiras de reagente Dextrostix, de acordo com as instruções dos fabricantes em todos os casos.

### Ninhadas

Ao nascimento, os filhotes foram contados e pesados e as ninhadas foram ajustadas para oito filhotes com um número igual de machos e fêmeas para evitar os efeitos de tamanho e distribuição sexual da ninhada no desenvolvimento. Todos os filhotes foram criados por suas mães biológicas. Os filhotes foram desmamados aos 28 dias, separados por sexo e alojados em grupos de dois por gaiola, de acordo com o grupo experimental (C- prole de mães não-estressadas, PS- prole de mães estressadas). O peso corporal e o consumo de alimentos e de água foram registrados durante os períodos pré- e pós-desmame. A prole foi sacrificada por decapitação aos dois meses de idade. Para evitar flutuações dependentes do ciclo estrogênico, a prole feminina foi sacrificada em diestro, que foi verificado por esfregaços vaginais.

### Isolação de RNA

O RNA total das porções basais e apicais dos ventrículos esquerdos foi isolado com o reagente TRI (Sigma, Alemanha)

Tabela 1 – Regime de estresse

	10:00-11:00	14:00-15:00	18:00-08:00
GD14	Contenção	Cama úmida	Inclinação da gaiola
GD15	Ambiente frio (4°C)	Deslocamento e barulho	Iluminação contínua
GD16	Cama úmida	Contenção	Inclinação da gaiola
GD17	Deslocamento e barulho	Ambiente frio (4°C)	Iluminação contínua
GD18	Contenção	Cama úmida	Inclinação da gaiola
GD19	Ambiente frio (4°C)	Deslocamento e barulho	Iluminação contínua
GD20	Cama úmida	Contenção	Inclinação da gaiola

\* GD: Dia da gestação.

de acordo com as instruções do fabricante. As concentrações totais de RNA foram quantificadas por medidas de absorvância a 260 e 280 nm utilizando um espectrofotômetro (Ultraspec 2000, Pharmacia Biotech, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. A qualidade de RNA foi analisada gel de agarose a 1,5 % com brometo de etídio e observada por transiluminação UV (ChemiDoc-It imager, UVP, Alemanha).

#### Síntese do cDNA e PCR quantitativa em tempo real

Amostras de RNA (2 µg) foram submetidas ao tratamento de DNase I, utilizando rDNase I, de acordo com o protocolo do fabricante (DNA-free kit, Ambion, EUA). Esferas Ready-to-go You-Prime First-Strand (GE Healthcare, USA) foram utilizadas para gerar cDNA para subsequente PCR quantitativa em tempo real. Amostras sem transcriptase reversa foram utilizadas para controlar a possível contaminação com gDNA. Todas as reações foram realizadas em duplicado utilizando TaqMan Master Mix (Applied Biosystems) uma vez e TaqMan expression assays uma vez para cada gene (Tabela 2: *Adrb1*, *Adrb2*, *Adrb3*, *MaoA*, *ActB*), com 2 µg de cDNA dentro de um volume total de 20 µl. Reações de PCR em tempo real foram realizadas no Applied Biosystem 7900 Real-Time PCR System, utilizando condições padrões de PCR (50°C durante 2 min; 95°C durante 10 min; 95°C durante 15 s e 60°C durante 1 min para 40 ciclos). Os níveis relativos de expressão gênica foram determinados pelo método  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  de quantificação comparativa,<sup>22</sup> usando beta-actina como gene de referência.

#### Análise estatística

Realizou-se análise estatística utilizando GraphPad Prism Software-version 6.01 (San Diego, EUA). Os parâmetros medidos nas mães e na prole foram expressos como média ± desvio padrão (DP). Os dados foram analisados pelo teste t de Student não pareado, a menos que indicado de outra forma. Os dados da prole obtidos por análise de PCR em tempo real foram expressos como mediana com intervalo interquartil. Utilizou-se análise ANOVA two-way com teste de comparação múltipla de Bonferroni para examinar os efeitos de estresse pré-natal e de gestação nos níveis ACTH no plasma materno e os efeitos do estresse pré-natal nos padrões de expressão dos genes ADRB nas regiões examinadas do ventrículo esquerdo da prole. Avaliou-se a significância estatística das diferenças entre os dados de

Tabela 2 – Ensaios de expressão TaqMan

Gene	TaqMan ID de ensaio
Receptor adrenérgico beta 1 ( <i>Adrb1</i> )	Rn00824536_s1
Receptor adrenérgico beta 2 ( <i>Adrb2</i> )	Rn00560650_s1
Receptor adrenérgico beta 3 ( <i>Adrb3</i> )	Rn01478698_g1
Monoamina oxidase A ( <i>Maoa</i> )	Rn01430955_A1
Beta-actina ( <i>Actb</i> )	Rn01412977_g1

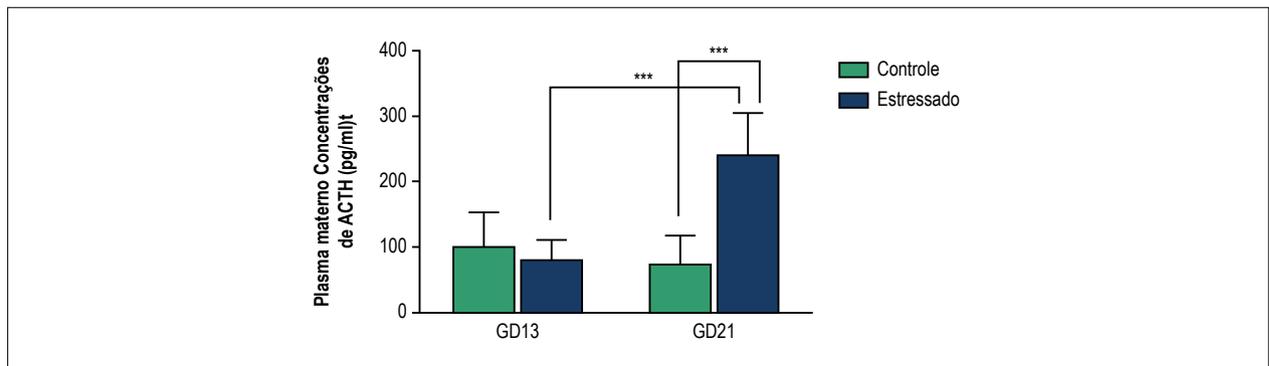
PCR em tempo real obtidos dos grupos experimentais com o teste U de Mann-Whitney não paramétrico. O nível de significância foi estabelecido em  $p < 0,05$ .

## Resultados

#### Efeitos do ECMI nos parâmetros das mães e da prole

Para determinar se o protocolo de estresse aplicado ativou o eixo HPA nas ratas prenhes, os níveis plasmáticos maternos de ACTH foram avaliados. Antes do início do protocolo de estresse (GD13), os níveis plasmáticos maternos de ACTH não foram significativamente diferentes entre os grupos experimentais (Figura 1). Após exposição aleatória e intermitente a uma variedade de estressores durante a terceira semana da gestação (GD13-21), os níveis plasmáticos maternos de ACTH aumentaram em comparação com controle (Figura 1,  $p < 0,001$ , ANOVA two-way com teste de comparação múltipla de Bonferroni). Adicionalmente, no grupo de mães estressadas, após a exposição a diversos estressores, os níveis plasmáticos de ACTH aumentaram em comparação com GD13, sugerindo que o eixo HPA foi ativado neste grupo experimental (Figura 1,  $p < 0,001$ , ANOVA two-way com teste de comparação múltipla de Bonferroni).

A ECMI não afetou o ganho de peso materno na última semana da gestação (Tabela 3) ou o consumo de água e de alimentos durante a gestação (dados não mostrados). Os níveis de glicose materna foram semelhantes nos dois grupos experimentais antes e depois da aplicação do protocolo de ECMI (Tabela 3). O estresse pré-natal não acarretou um efeito no tamanho das ninhadas ou na relação machos/fêmeas na prole (Tabela 3). O estresse materno



**Figura 1** – Concentrações de ACTH no plasma materno antes (GD13) e depois (GD21) da exposição ao ECMI durante a gestação. Os dados são expressos em média  $\pm$  SD, grupo controle (barras brancas, n = 5), grupo estressado (barras pretas, n = 6). No grupo estressado, no GD21, duas amostras foram excluídas devido à hemólise. \*\*\* $p < 0,001$ , ANOVA two-way com teste de comparação múltipla de Bonferroni.

**Tabela 3** – Peso materno antes do tratamento, ganho de peso materno durante a última semana da gestação (GD13-GD21), duração da gestação, níveis séricos de glicose antes e depois do estresse, tamanho da ninhada e relação machos/fêmeas

Variável	Controle (n = 5)	Estressado (n = 5)	p
Peso materno antes do tratamento (g)	347 $\pm$ 37,3	337 $\pm$ 40,2	0,6646
Ganho de peso materno (g)	62,5 $\pm$ 4,43	50,5 $\pm$ 11,6	0,0872
Duração da gestação (dias)	22,0 $\pm$ 0,71	22,2 $\pm$ 0,41	0,6355
Níveis séricos de glicose (mM) antes do estresse (GD13)	5,44 $\pm$ 0,21	5,55 $\pm$ 1,00	0,8162
Níveis séricos de glicose (mM) após estresse (GD21)	5,30 $\pm$ 0,42	5,63 $\pm$ 0,69	0,3737
Tamanho da ninhada	11,2 $\pm$ 2,77	11,8 $\pm$ 2,32	0,6891
Relação machos/fêmeas	1,38 $\pm$ 0,4	1,18 $\pm$ 0,3	0,3805

GD13: dia 13 da gestação; GD21: dia 21 da gestação; os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP)

durante a última semana de gestação não afetou o peso ao nascimento ou o ganho de peso dos filhos durante os períodos pré ou pós-desmame (Tabela 4).

#### Efeitos do estresse pré-natal na expressão gênica regional do subtipo ADRB no ventrículo esquerdo da prole feminina e masculina

Utilizou-se análise de PCR quantitativo para examinar os níveis relativos de ADRB1, ADRB2 e ADRB3 nas regiões apicais e basais dos ventrículos coletados do controle (C) e da prole de adultos femininos e masculinos prenatalmente estressados (PS).

Foi indetectável o mRNA de ADRB3 nas regiões examinadas do ventrículo esquerdo da prole feminina e masculina.

No ápice e na base do ventrículo esquerdo do controle feminino, detectou-se maior expressão de mRNA de ADRB1 em comparação com os níveis de mRNA de ADRB2. (Figura 2A e 2C, aprox. ADRB1/ADRB2 = 73%/23%,  $p < 0,01$ ). Níveis diminuídos de mRNA de ADRB1 apical foram detectados na prole feminina PS em comparação com animais controle (Figura 2A,  $p = 0,048$ ). Adicionalmente, na prole feminina PS, observou-se uma tendência de aumento nos níveis de mRNA de ADRB2 apical em comparação com o controle. Visto que estas alterações resultaram na perda dos

níveis de expressão diferenciais do subtipo ADRB no miocárdio apical da prole feminina PS, realizou-se a análise ANOVA two-way. A análise ANOVA revelou interação significativa entre o tratamento pré-natal e os níveis de expressão do subtipo de receptor ( $F(1,20) = 6,817$ ,  $p = 0,0167$ ). Vistos em conjunto, estes resultados indicam que o estresse pré-natal afetou ADRB1 e ADRB2 diferentemente no miocárdio apical de animais femininos. Além disso, observou-se uma tendência à diminuição nos níveis basais de mRNA de ADRB1 da prole feminina PS em comparação com controle (Figura 2C  $p = 0,3434$ ), de tal forma que o miocárdio basal da prole feminina PS não exibiu padrão de expressão diferencial de mRNA de ADRB1 e ADRB2 em comparação com animais de controle. Não se pode excluir o efeito do tamanho limitado da amostra para detectar diferenças significativas na expressão gênica de ADRB entre os grupos controle e PS. Pesquisas futuras serão necessárias para alcançar uma compreensão mais detalhada dos mecanismos subjacentes que resultam em um padrão alterado de expressão gênica de receptores adrenérgicos cardíacos basais da prole feminina PS.

A prole masculina das mães não estressadas, de maneira semelhante à prole feminina, apresentou níveis de mRNA de ADRB1 mais altos que de ADRB2 no ápice do ventrículo esquerdo. (Figura 2B,  $p = 0,0087$ ). Porém, diferentemente da prole feminina, na prole masculina o estresse pré-natal

Tabela 4 – Peso da prole ao nascimento, no 28º dia pós-natal (PND28) e no 60º dia pós-natal (PND60)

Variável		C	PS	p
Peso ao nascimento (g)	Grupo	6,67 ± 0,904	6,39 ± 0,685	0,1562
	Grupo	94,5 ± 11,4	96,9 ± 13,2	0,6360
Peso no PND28 (g)	Masculina	96,8 ± 12,3	94,5 ± 10,3	0,7286
	Feminina	92,2 ± 11,1	99,3 ± 16,2	0,3924
Peso no PND60 (g)	Grupo	316 ± 50,9	317 ± 70,5	0,9790
	Masculina	355 ± 29,7	377 ± 42,7	0,3354
	Feminina	277 ± 33,6	257 ± 21,7	0,2454

C: prole de mães não estressadas; PS: prole de mães estressadas; PND28: 28º dia pos-natal; PND60: 60º dia pos-natal; número de animais (n): n = 5-8 per grupo. Os dados são expressos como média ± desvio padrão (DP)

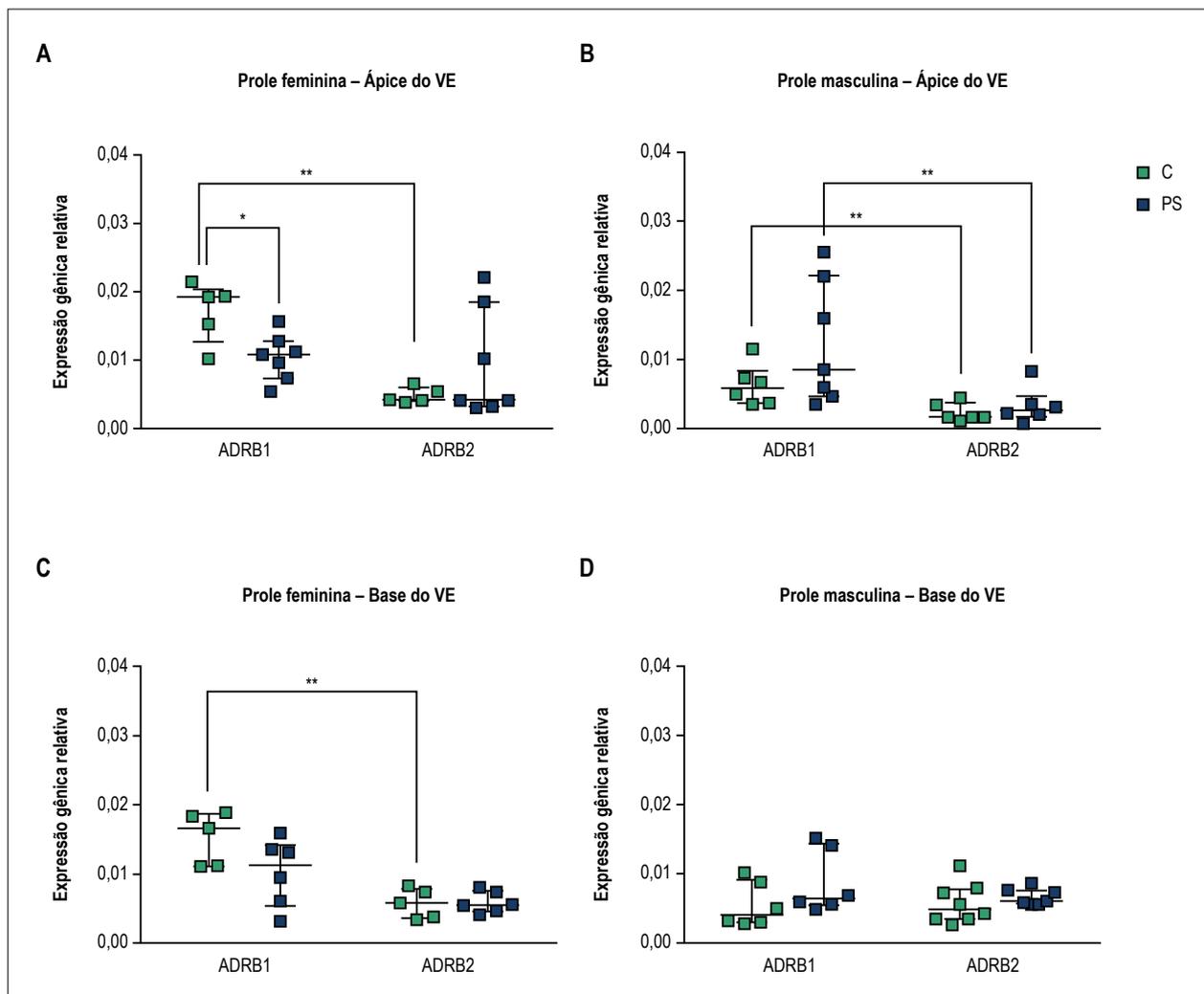


Figura 2 – Efeitos do estresse pré-natal na expressão do mRNA de receptores adrenérgicos beta 1 (ADRB1) e beta 2 (ADRB2) no ápice e na base do ventrículo esquerdo (VE) da prole. Apresentam-se resultados para prole feminina (A e C) e masculina (B e D) de mães não estressadas (controle-C) e estressadas (estresse pré-natal-PS). Dados são expressos como mediana com intervalo interquartilico (número de animais per grupo, n = 5-8). \*p < 0,05; \*\*p < 0,01, teste U de Mann-Whitney.

não afetou o padrão de expressão apical predominante de mRNA de ADRB1 no ventrículo esquerdo (Figura 2B). Por outro lado, detectaram-se níveis similares de expressão

de mRNA de ADRB1 e ADRB2 na base do ventrículo esquerdo na prole masculina prenatalmente estressada e controle (Figura 2D).

### Efeitos do estresse pré-natal na expressão gênica regional de MAO-A no ventrículo esquerdo da prole feminina e masculina

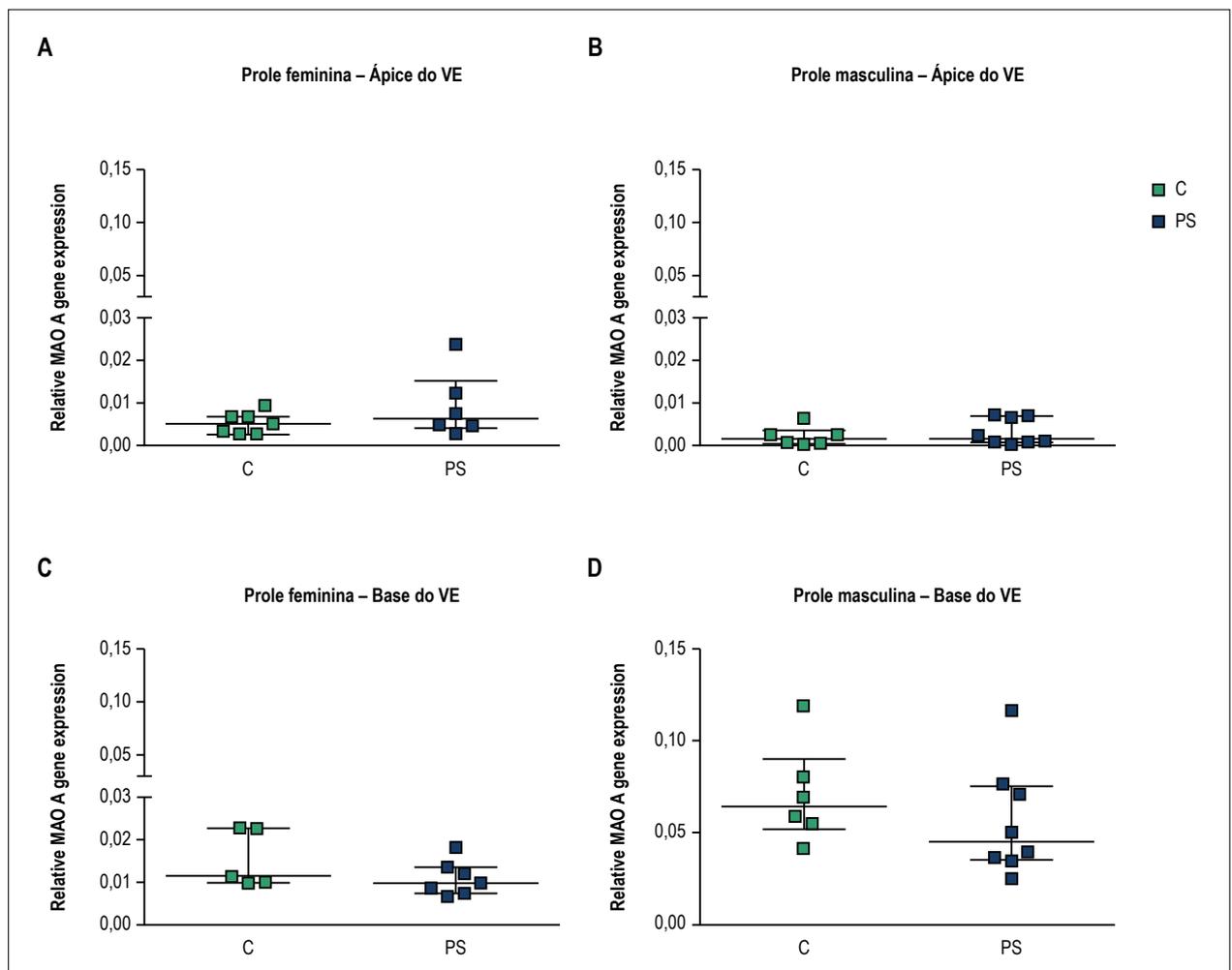
O estresse pré-natal não afetou significativamente a expressão de mRNA de MAO-A na região apical ou basal do ventrículo esquerdo na prole feminina e masculina (Figura 3). Com base nos nossos resultados, observa-se uma tendência de maior expressão relativa de MAO-A no miocárdio basal em comparação com a região apical do ventrículo esquerdo na prole masculina (aproximadamente 35 vezes no controle e 17,5 vezes nos animais do PS, Figura 3B e 3D). Adicionalmente, a MAO-A cardíaca basal demonstrou uma tendência de maior expressão na prole masculina que na feminina (Figura 3C e 3D, aprox. 4,7 vezes entre os grupos controle e 5,1 vezes entre grupos PS).

### Discussão

As doenças cardiovasculares são a principal causa de morbidade e mortalidade no mundo.<sup>23</sup> Demonstrou-se que vários distúrbios no desenvolvimento fetal podem contribuir

para o desenvolvimento de distúrbios cardiovasculares na vida adulta. Prole de mães que sofrem estresse ou mães submetidas a terapia com glicocorticóides durante a gestação apresentam várias alterações neuroendócrinas e comportamentais durante a vida adulta.<sup>24-26</sup> O presente estudo examinou a expressão de subtipos de ADRB e MAO-A em diferentes regiões do ventrículo esquerdo de prole feminina e masculina prenatalmente exposta a estresse materno.

Aplicou-se um protocolo de estresse a ratas prenhes que pudesse imitar o estresse da vida cotidiana ao qual as mulheres grávidas são expostas. Nosso protocolo de estresse envolveu exposição crônica a vários estressores moderados. Isto impede a habituação que pode ser observada após exposição repetida ao mesmo estressor.<sup>27</sup> Níveis séricos de ACTH são elevados nas mães estressadas quando comparadas com ratas não estressadas, o que indica que atividade no eixo HPA de fêmeas gestantes foi aumentada pelo protocolo ECMI e isto é consistente com estudos anteriores.<sup>28, 29</sup> Não observaram-se diferenças significativas em parâmetros metabólicos, como ganho de peso materno durante a gestação, consumo de água



**Figura 3** – Efeitos do estresse pré-natal no mRNA de monoamina oxidase A (MAO-A) no ápice e na base do ventrículo esquerdo (VE) da prole. Apresentam-se resultados para prole feminina (A e C) e masculina (B e D) de mães não estressadas (controle-C) e estressadas (estresse pré-natal-PS). Dados são expressos como mediana com intervalo interquartilico (número de animais per grupo, n = 5-8).

e alimentos, ou nível sérico de glicose entre mães estressadas e sem estresse. O estresse materno durante a última semana de gestação também não afetou o tamanho da ninhada ou o peso ao nascimento. Vistos em conjunto, estes resultados sugerem que nosso modelo de ECMI foi potente o suficiente para induzir uma resposta de estresse em ratos prenhes, mas não afetou o peso da prole, o qual é conhecido como um dos fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares em adultos.<sup>2</sup>

Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a relatar níveis relativos de expressão gênica de subtipos de receptores beta-adrenérgicos em duas regiões diferentes do ventrículo esquerdo de ratos. Nossos resultados mostram que o ADRB1 é o subtipo predominantemente expresso na população de ADRB cardíaco no miocárdio apical e basal do ventrículo esquerdo da prole de ratas não estressadas. Detectou-se também maior expressão nos níveis de mRNA de ADRB1 em comparação com os de ADRB2 na região ventricular apical na prole masculina controle. De fato, vários estudos em humanos e em outros animais demonstraram maior ADRB1 que ADRB2 no ventrículo esquerdo.<sup>30-34</sup> Porém, os nossos resultados não são consistentes com os achados relatados por Paur et al.,<sup>35</sup> que usou ensaios de ligação radioligante. Eles demonstraram um aumento na relação ADRB2/ADRB1 nos cardiomiócitos apicais isolados de ratos Sprague-Dawley machos adultos. Essas discrepâncias podem ser explicadas por diferenças de método e de sistemas de modelo. Diferentemente da prole feminina, na prole masculina os níveis de mRNA de ADRB1 e ADRB2 foram expressos de forma semelhante no miocárdio basal do ventrículo esquerdo. Não detectou-se mRNA de ADRB3 no ventrículo esquerdo dos ratos.

Os nossos resultados sugerem que há representações de expressão gênica sexo- e região-específicas de subpopulações de ADRB no miocárdio do ventrículo esquerdo de ratos. Adicionalmente, os dados do nosso estudo indicam que o estresse pré-natal pode ter afetado o padrão da expressão gênica de ADRB1 e ADRB2 na região apical do ventrículo esquerdo na prole feminina, mas não na prole masculina. A representação perturbada de subtipos de receptores adrenérgicos cardíacos tem sido descrita em patologias cardiovasculares. A insuficiência cardíaca é caracterizada pela alteração da relação ADRB1/ADRB2, em parte devido à diminuição da proteína ADRB1 e do mRNA no ventrículo esquerdo.<sup>11,36</sup> A redução não seletiva de subpopulações de receptores beta-adrenérgicos também observou-se nos corações de animais envelhecidos<sup>37</sup> e de pacientes idosos.<sup>31,34</sup> Nossos resultados indicam que o estresse pré-natal resultou na diminuição da expressão apical do mRNA de ADRB1, sugerindo que a região do miocárdio apical da prole feminina pode ser sensível à exposição ao estresse durante a vida fetal. É de interesse que, na cardiomiopatia induzida por estresse, também conhecida por cardiomiopatia de Takotsubo, descreve-se uma maior sensibilidade na região apical do ventrículo esquerdo ao estresse durante a vida adulta.<sup>35,38</sup> Além disso, essa síndrome é predominantemente diagnosticada em mulheres.<sup>38</sup>

Outra proteína envolvida na modulação simpática da função cardíaca é a MAO-A. Esta enzima catalisa a oxidação de monoaminas durante a qual espécies reativas do oxigênio são produzidas e pode contribuir para a

patogênese das doenças cardiovasculares.<sup>15</sup> Até onde sabemos, este é o primeiro estudo a investigar os efeitos de estresse pré-natal na expressão gênica de MAO-A cardíaca na prole. O presente estudo não detectou alterações significativas nos níveis de mRNA da MAO-A no coração pré-natal feminino ou masculino.

Há várias limitações neste estudo. Como mencionado acima, não podemos desconsiderar o efeito do tamanho de amostra limitado na detecção de diferenças significativas adicionais na expressão gênica região-específica de subpopulações de receptor beta-adrenérgico miocárdico. Desconhece-se o mecanismo responsável pela expressão diminuída de mRNA de ADRB1 no miocárdio apical na prole feminina prenatalmente estressada, mas não na masculina. Podemos apenas formar a hipótese, baseada na literatura, que hormônios sexuais possam exercer um efeito. Seria, portanto, interessante investigar os estágios iniciais de desenvolvimento da prole prenatalmente estressada. Além disso, não comparamos os níveis de expressão cardíaca de MAO-A entre a prole masculina e a feminina. Porém, com base nos níveis relativos de expressão de MAO-A, podemos supor que nossos resultados sugerem que a MAO-A cardíaca exibe um padrão de expressão gênica de maneira dimórfica, provavelmente sendo mais abundante no coração de ratos machos do que em fêmeas. Considerando que MAO-A é a principal fonte de peróxido de hidrogênio no coração, a nossa observação seria consistente com a produção diminuída de peróxido de hidrogênio relatada em mitocôndrias cardíacas de ratos Wistar fêmeas, em comparação com machos.<sup>39</sup>

## Conclusões

Em resumo, os nossos dados sugerem que estresse pré-natal pode exercer, já na idade adulta jovem, alterações sexo-específicas nas subpopulações de receptores adrenérgicos cardíacos apicais e basais em prole. Pesquisas futuras serão necessárias para determinar se essas mudanças são correlacionadas com o desempenho cardíaco diminuído e se essas predisõem organismos a desenvolver doenças cardiovasculares durante a vida.

## Contribuição dos autores

Concepção e desenho da pesquisa, análise estatística e redação do manuscrito: Jevjdovic T; obtenção de dados: Dakic T, Kopanja S; análise e interpretação dos dados: Jevjdovic T, Dakic T, Kopanja S, Lakic I, Vujovic P; obtenção de financiamento: Djordjevic J; revisão crítica do manuscrito quanto ao conteúdo intelectual importante: Lakic I, Vujovic P, Jasic N, Djordjevic J.

## Potencial conflito de interesses

Declaro não haver conflito de interesses pertinentes.

## Fontes de financiamento

O presente estudo foi financiado pelo Ministério da Educação, Ciência e Desenvolvimento Tecnológico, República da Sérvia (número da bolsa: 173023).

### Vinculação acadêmica

Este artigo é parte de dissertação de Mestrado de Tanja Jevdjovic pela Faculty of Biology, University of Belgrade.

### Aprovação ética e consentimento informado

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Faculdade de Biologia da Universidade de Belgrado sob o número de protocolo EK-BF-2015/25.

### Errata

No artigo "Efeitos Sexo-Específicos de Estresse Pré-Natal na Expressão Região Específica de Monoamina Oxidase A e Receptores Adrenérgicos B no Coração de Ratos", considerar como correta a grafia Tanja Jevdjovic para o nome da autora Tanja Jevdjovic.

### Referências

- Dong M, Zheng Q, Ford SP, Nathanielsz PW, Ren J. Maternal obesity, lipotoxicity and cardiovascular diseases in offspring. *J Mol Cell Cardiol.* 2013 Feb;55:111-6.
- Roseboom TJ, van der Meulen JH, Osmond C, Barker DJ, Ravelli AC, Schroeder-Tanka JM, et al. Coronary heart disease after prenatal exposure to the Dutch famine, 1944-45. *Heart.* 2000;84(6):595-8.
- Hoet JJ, Hanson MA. Intrauterine nutrition: its importance during critical periods for cardiovascular and endocrine development. *J Physiol.* 1999;514(Pt 3):617-27.
- Bertram CE, Hanson MA. Prenatal programming of postnatal endocrine responses by glucocorticoids. *Reproduction.* 2002;124(4):459-67.
- Igosheva N, Klimova O, Anishchenko T, Glover V. Prenatal stress alters cardiovascular responses in adult rats. *J Physiol.* 2004;557(Pt 1):273-85.
- Henry C, Kabbaj M, Simon H, Le Moal M, Maccari S. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol.* 1994;6(3):341-5.
- Takahashi LK, Turner JG, Kalin NH. Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adult rats. *Brain Res.* 1992;574(1-2):131-7.
- Dzimiri N. Regulation of beta-adrenoceptor signaling in cardiac function and disease. *Pharmacol Rev.* 1999;51(3):465-501.
- Bristow MR, Ginsburg R, Minobe W, Cubicciotti RS, Sageman WS, Lurie K, et al. Decreased catecholamine sensitivity and beta-adrenergic-receptor density in failing human hearts. *N Engl J Med.* 1982;307(4):205-11.
- Emorine LJ, Marullo S, Briend-Sutren MM, Patey G, Tate K, Delavier-Klutchko C, et al. Molecular characterization of the human beta 3-adrenergic receptor. *Science.* 1989;245(4922):1118-21.
- Engelhardt S, Bohm M, Erdmann E, Lohse MJ. Analysis of beta-adrenergic receptor mRNA levels in human ventricular biopsy specimens by quantitative polymerase chain reactions: progressive reduction of beta 1-adrenergic receptor mRNA in heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27(1):146-54.
- Milano CA, Allen LF, Rockman HA, Dolber PC, McMinn TR, Chien KR, et al. Enhanced myocardial function in transgenic mice overexpressing the beta 2-adrenergic receptor. *Science.* 1994;264(5158):582-6.
- Liggett SB, Tepe NM, Lorenz JN, Canning AM, Jantz TD, Mitarai S, et al. Early and delayed consequences of beta(2)-adrenergic receptor overexpression in mouse hearts: critical role for expression level. *Circulation.* 2000;101(14):1707-14.
- Wittstein IS, Thiemann DR, Lima JA, Baughman KL, Schulman SP, Gerstenblith G, et al. Neurohumoral features of myocardial stunning due to sudden emotional stress. *N Engl J Med.* 2005;352(6):539-48.
- Kaludercic N, Mialet-Perez J, Paolucci N, Parini A, Di Lisa F. Monoamine oxidases as sources of oxidants in the heart. *J Mol Cell Cardiol.* 2014 Aug;73:34-42.
- Petrak J, Pospisilova J, Sedinova M, Jedelsky P, Lorkova L, Vit O, et al. Proteomic and transcriptomic analysis of heart failure due to volume overload in a rat aorto-caval fistula model provides support for new potential therapeutic targets - monoamine oxidase A and transglutaminase 2. *Proteome Sci.* 2011;9(1):69.
- Kong SW, Bodyak N, Yue P, Liu Z, Brown J, Izumo S, et al. Genetic expression profiles during physiological and pathological cardiac hypertrophy and heart failure in rats. *Physiol Genomics.* 2005;21(1):34-42.
- Strom CC, Kruhoffer M, Knudsen S, Stensgaard-Hansen F, Jonassen TE, Orntoft TF, et al. Identification of a core set of genes that signifies pathways underlying cardiac hypertrophy. *Comp Funct Genomics.* 2004;5(6-7):459-70.
- Maurel A, Hernandez C, Kunduzova O, Bompard G, Cambon C, Parini A, et al. Age-dependent increase in hydrogen peroxide production by cardiac monoamine oxidase A in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284(4):H1460-7.
- Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5(5):425-38.
- Xhyheri B, Bugiardini R. Diagnosis and treatment of heart disease: are women different from men? *Prog Cardiovasc Dis.* 2010;53(3):227-36.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
- Murray CJ, Lopez AD. Measuring the global burden of disease. *N Engl J Med.* 2013;369(5):448-57.
- Matthews SG. Early programming of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Trends Endocrinol Metab.* 2002;13(9):373-80.
- Talge NM, Neal C, Glover V, Early Stress TR, Prevention Science Network F, Neonatal Experience on C, et al. Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why? *J Child Psychol Psychiatry.* 2007;48(3-4):245-61.
- Lunghi L, Pavan B, Biondi C, Paolillo R, Valerio A, Vesce F, et al. Use of glucocorticoids in pregnancy. *Curr Pharm Des.* 2010;16(32):3616-37.
- Kant GJ, Eggleston T, Landman-Roberts L, Kenion CC, Driver GC, Meyerhoff JL. Habituation to repeated stress is stressor specific. *Pharmacol Biochem Behav.* 1985;22(4):631-4.
- Amugongo SK, Hlusko LJ. Impact of maternal prenatal stress on growth of the offspring. *Aging Dis.* 2014;5(1):1-16.
- Maghsoudi N, Ghasemi R, Ghaempanah Z, Ardekani AM, Nooshinfar E, Tahzibi A. Effect of chronic restraint stress on HPA axis activity and expression of BDNF and trkb in the hippocampus of pregnant rats: possible contribution in depression during pregnancy and postpartum period. *Basic Clin Neurosci.* 2014;5(2):131-7.

30. Steinfath M, Lavicky J, Schmitz W, Scholz H, Doring V, Kalmar P. Regional distribution of beta 1- and beta 2-adrenoceptors in the failing and nonfailing human heart. *Eur J Clin Pharmacol.* 1992;42(6):607-11.
31. Lindenfeld J, Cleveland JC, Jr., Kao DP, White M, Wichman S, Bristow JC, et al. Sex-related differences in age-associated downregulation of human ventricular myocardial beta1-adrenergic receptors. *J Heart Lung Transplant.* 2016;35(3):352-61.
32. Lathers CM, Levin RM, Spivey WH. Regional distribution of myocardial beta-adrenoceptors in the cat. *Eur J Pharmacol.* 1986;130(1-2):111-7.
33. Izumi Y, Okatani H, Shiota M, Nakao T, Ise R, Kito G, et al. Effects of metoprolol on epinephrine-induced takotsubo-like left ventricular dysfunction in non-human primates. *Hypertens Res.* 2009;32(5):339-46.
34. White M, Roden R, Minobe W, Khan MF, Larrabee P, Wollmering M, et al. Age-related changes in beta-adrenergic neuroeffector systems in the human heart. *Circulation.* 1994;90(3):1225-38.
35. Paur H, Wright PT, Sikkil MB, Tranter MH, Mansfield C, O'Gara P, et al. High levels of circulating epinephrine trigger apical cardiodepression in a beta2-adrenergic receptor/Gi-dependent manner: a new model of Takotsubo cardiomyopathy. *Circulation.* 2012;126(6):697-706.
36. Bristow MR, Ginsburg R, Umans V, Fowler M, Minobe W, Rasmussen R, et al. Beta 1- and beta 2-adrenergic-receptor subpopulations in nonfailing and failing human ventricular myocardium: coupling of both receptor subtypes to muscle contraction and selective beta 1-receptor down-regulation in heart failure. *Circ Res.* 1986;59(3):297-309.
37. Xiao RP, Tomhave ED, Wang DJ, Ji X, Boluyt MO, Cheng H, et al. Age-associated reductions in cardiac beta1- and beta2-adrenergic responses without changes in inhibitory G proteins or receptor kinases. *J Clin Invest.* 1998;101(6):1273-82.
38. Lyon AR, Rees PS, Prasad S, Poole-Wilson PA, Harding SE. Stress (Takotsubo) cardiomyopathy--a novel pathophysiological hypothesis to explain catecholamine-induced acute myocardial stunning. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5(1):22-9.
39. Colom B, Oliver J, Roca P, Garcia-Palmer FJ. Caloric restriction and gender modulate cardiac muscle mitochondrial H2O2 production and oxidative damage. *Cardiovasc Res.* 2007;74(3):456-65.

