



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Dpto. Bioquímica y Biología molecular.

**“ESTRÉS CRÓNICO INTERMITENTE APLICADO EN
RATAS DURANTE EL PERÍODO DE GESTACIÓN INDUCE
“PROGRAMMING” SOBRE EL TEJIDO CARDÍACO EN LA
DESCENDENCIA DE RATAS MACHOS”**

Memoria para optar al título de Químico Farmacéutico por:

GABRIELA CATALINA BAHAMONDES VIDAL

Directores de Tesis

Dr. Hernán Lara Peñaloza- Dr. Guillermo Díaz Araya

Profesor Patrocinante

Dr. Hernán Lara Peñaloza.

Santiago, Chile

2011

Financiamiento

Esta memoria se realizó en el Laboratorio de Neurobioquímica, Departamento de Bioquímica y Biología molecular y en el Laboratorio de Farmacoquímica, Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica, ambos emplazados en la Facultad de Ciencias Químicas Farmacéuticas, Universidad de Chile. Contó con el financiamiento de Proyecto FONDECYT 1090036

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE GENERAL.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
ABREVIATURAS.....	V
RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	2
1.- INTRODUCCIÓN.....	3
1.1- “Fetal programming”.....	3
1.2- Estrés y su efecto fisiológico.....	5
1.2.1- Respuesta neuroquímica al estrés por frío.....	6
1.2.2- Efecto estrés por frío en la descendencia.....	8
1.2.3- Efecto del estrés por frío durante el embarazo y desarrollo fetal.....	8
1.3- Sistema cardiovascular.....	10
1.3.1- Características generales.....	10
1.3.2- Remodelamiento cardiaco.....	10
1.3.3- Factores activados en hipertrofia cardiaca.....	11
1.3.4- Sistema adrenérgico en el desarrollo de hipertrofia cardiaca.....	12
1.3.4.1- Modelo de Isoproterenol para el desarrollo de hipertrofia cardiaca.....	12
1.3.5- Cambios en la matriz extracelular por remodelamiento cardiaco.....	14
2.- HIPÓTESIS.....	15
3.- OBJETIVO GENERAL.....	15
4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15

5.- MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
5.1.- Materiales.....	16
5.2.- Modelo de estrés por frío crónico.....	16
5.2.1.- Material biológico.....	16
5.2.2.- Modelo de hipertrofia y fibrosis cardiaca.....	18
5.2.3.- Obtención de muestras.....	19
5.2.4.- Evaluación de la hipertrofia y fibrosis ventricular.....	20
5.2.5.- Análisis morfológicos y morfométricos del cardiomiocito.....	21
5.2.6.- Obtención de extractos proteicos de ventrículo izquierdo.....	22
5.2.7.- Cuantificación de proteínas.....	23
5.3.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	23
5.3.1.- Electrotransferencia de proteínas.....	23
5.3.2.- Western blot.....	23
5.4.- Análisis estadístico.....	24
6.- RESULTADOS.....	25
6.1.- Efecto de “Fetal Programming” a nivel de remodelamiento del tejido cardíaco en crías machos (neonatos, prepúberes y adultos).....	25
6.1.1.- Comparación peso corporal en diferentes edades.....	25
6.1.2.- Comparación parámetros morfométricos.....	26
6.1.3.- Comparación área y perímetro de cardiomiocitos.....	26
6.1.4.- Cuantificación proteína β -MHC y Colágeno tipo I por Inmuno Western Blot.....	29
6.2.- Efecto de una dosis/día/10 días de isoproterenol sobre el remodelamiento cardiaco en animales adultos que sufrieron “Fetal Programming”.....	31
6.2.1.- Parámetros morfométricos.....	32
6.2.2.- Medición área y perímetro cardiomiocitos en ratas adulto jóvenes tratadas.....	34
6.2.3.- Cuantificación proteína β -MHC y Colágeno tipo I por Inmuno Western Blot.....	37
7.- DISCUSIÓN.....	41

Efecto “Fetal programming” en descendencia de ratas machos.....	41
Efecto de estrés por frío en el tamaño de la descendencia al nacer.....	42
Respuesta del corazón ante el crecimiento normal de la descendencia de madres estresadas.....	44
Respuesta hipertrófica ante tratamientos con isoproterenol.....	46
Nuevas perspectivas.....	50
8.- CONCLUSIONES.....	53
REFERENCIAS.....	55

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Respuesta adaptativa de la placenta y “fetal programming”.....	5
Figura 2 Efectos del estrés por frío (4 y -3°C) sobre los niveles de ACTH, NA y A.....	7
Figura 3 Hipertrofia cardíaca.....	11
Figura 4 Protocolo grupo control y estrés por frío.....	17
Figura 5 Protocolo inyección isoproterenol 1 mg/Kg peso/ día.....	19
Figura 6 Esquema representativo de la metodología de morfometría de cardiomiocitos <i>in vivo</i>	21
Figura 7 Individualización de cardiomiocitos.....	22
Figura 8 Comparación peso corporal entre ratas controles y estresadas.....	25
Figura 9 Comparación MCT/MC y MV/ MC entre ratas sin tratamiento.....	26
Figura 10 Fotografías de cortes de corazón de ratas prepúberes y adultas provenientes de madres control y estresadas.....	27
Figura 11 Cuantificación área y perímetro cardiomiocitos.....	28
Figura 12 Cuantificación proteína β -MHC entre ratas sin tratamiento.....	29
Figura 13 Cuantificación proteína Colágeno tipo I en ratas sin tratamiento.....	30
Figura 14 Mortalidad de ratas tratadas con Isoproterenol. Curva Kaplan-Mayer.....	31
Figura 15 Comparación MCT/MC y MV/MC entre ratas tratadas.....	33
Figura 16 Fotografías de cortes histológicos de ratas adulto joven que fueron tratadas con isoproterenol o PBS.....	35
Figura 17 Cuantificación área y perímetro cardiomiocitos.....	36
Figura 18 Cuantificación proteína β -MHC ratas adulto joven tratadas.....	38
Figura 19 Cuantificación proteína Colágeno tipo I entre ratas tratadas.....	39
Figura 20 Fotografías de cortes histológicos teñidos con Tricromo Masson.....	40

ABREVIATURAS

α 1AR	: Receptor α 1- Adrenérgico
α 2AR	: Receptor α 2- Adrenérgico
A	: Adrenalina
AC	: Adenilato ciclasa
AMPc	: Adenosin monofosfato cíclico
AMPK	: Proteína quinasa activada por AMP
β - AR	: Receptor β - Adrenérgico
β - MHC	: Cadena pesada de β - miosina
CA	: Ratas Control Adultas
CI	: Ratas Control Adulto joven inyectadas con Isoproterenol
CN	: Ratas Control Neonatas
CP	: Ratas Control Prepúberes
CPBS	: Ratas Control Adulto joven inyectadas con tampón fosfato salino
DTT	: Ditioneitol
EA	: Ratas Estresadas Adultas
EI	: Ratas Estresadas Adulto joven inyectadas con Isoproterenol
EN	: Ratas Estresadas Neonatas
EP	: Ratas Estresadas Prepúberes
EPBS	: Ratas Estresadas Adulto joven inyectadas con tampón fosfato salino
FP	: "Fetal programming"
GPCRs	: Receptores acoplados a proteína G
HC	: Hipertrofia cardíaca
HCl	: Ácido Clorhídrico
HVI	: Hipertrofia Ventricular Izquierda
ISO	: Isoproterenol

mA	: Miliamperes
MAPK	: Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MC	: Masa Corporal
MCT	: Masa cardíaca total
mM	: Milimolar
MV	: Masa Ventricular
MVI	: Masa Ventricular Izquierda
NaCl	: Cloruro de sodio
Na ₃ VO ₄	: Ortovanadato de sodio
NA	: Noradrenalina
NFAT	: Factor nuclear de células T activadas
Ng	: Nanogramos
nM	: Nanomolar
PBS	:Tampón fosfato salino
PKA	: Proteína quinasa A
PKC	: Proteína quinasa C
PMSF	: Fenilmetilsulfonifluoruro
SDS	: Dodecil sulfato de sodio
SEM	: Error estándar
TBS	: Tampón tris salino
Tris	: Tris- (hidroximetil)- aminoetano
V	: Volts
VI	: Ventrículo izquierdo

Resumen

La exposición al frío, activa los nervios simpáticos periféricos y aumenta la tasa de recambio de noradrenalina en órganos con inervación simpática. Este aumento de las concentraciones de noradrenalina en una madre gestante sometida a estrés por frío de 4°C por 3 horas diarias durante el periodo gestacional, causarían: a.- vasoconstricción a nivel placentario acompañado de una hipoxia fetal, y/o b.- proliferación de la vasculatura placentaria. Tales mecanismos adaptativos debido a la hipoxia fetal, podrían involucrar una entrega mayor de nutrientes y hormonas y gatillar mecanismos adaptativos del feto para sobrevivir a estas nuevas condiciones, especialmente en la función cardíaca. Inicialmente esta adaptación presentará un beneficio en términos de supervivencia, pero posteriormente podría gatillar hipertrofia cardíaca.

Así, este estudio evaluó el efecto sobre la morfología cardíaca producida por exposición fetal a estrés por frío crónico (4°C, 3h/día, 21 días), en la descendencia de machos y la respuesta a la estimulación β -adrenérgica (Isoproterenol) en ratas adultas.

Para ello, se usó ratas machos Sprague-Dawley en distintas etapas de crecimiento (neonatal, prepúberal y adultas) utilizando ratas de la misma edad- no estresadas- como control. Utilizando parámetros morfométricos (Masa cardíaca total (MCT)/ masa corporal (MC) y masa ventricular (MV)/ masa corporal), medición de área y perímetro en cardiomiocitos y marcadores bioquímicos tales como cadena pesada de β - Miosina (β -MHC) y colágeno tipo I, no se encontraron cambios en todos los grupos de estudio: neonatos, prepúberes y adultos, indicando que no hay hipertrofia ni fibrosis cardíaca. Por último, para evaluar el efecto de la estimulación β -adrenérgica *in vivo* de los animales, administramos por vía SC, el agonista adrenérgico Isoproterenol (1 mg/Kg peso/día/ 10 días en ratas adultas), para inducir hipertrofia y fibrosis. Las crías prenatalmente expuestas a estrés presentan una mayor respuesta al medicamento expresado como mayor respuesta hipertrófica, pero no así fibrótica en comparación a las ratas del grupo control. Además, presentaron una alta tasa de mortalidad en respuesta al tratamiento sugiriendo fuertemente una mayor sensibilidad a la droga.

El conjunto de estos resultados nos sugieren que la sobreactivación simpática durante el embarazo debido al estrés, afecta la función cardíaca de la prole de una forma que apoya fuertemente una programación de la función cardíaca y con ello, una mayor sensibilidad a una nueva estimulación adrenérgica cuando adultos.

Summary

CHRONIC INTERMITTENT STRESS APPLIED IN RATS DURING PREGNANCY INDUCES "PROGRAMMING" ON THE HEART TISSUE IN THE OFFSPRING OF MALE RATS

Cold exposure specifically activates the peripheral sympathetic nerves and increases norepinephrine turnover rate in organs with sympathetic innervation. This increase in norepinephrine plasma levels in a pregnant rat subjected to cold stress of 4 ° C for 3 hours daily during the gestational period, cause: a. - placental vasoconstriction accompanied by fetal hypoxia, and / or b – proliferation of placental vasculature. Such adaptive mechanism due to fetal hypoxia, would involve a greater delivery of nutrients and hormones, and trigger fetal adaptive mechanisms to survive under these new conditions, especially in cardiac function. Initially, this adaptation will present a benefit in terms of survival, but after delivery it could trigger cardiac hypertrophy.

Thus, this study evaluated the effect on heart morphology produced by fetal exposure to chronic cold stress (4 ° C, 3h/day, 21 days) in male offspring, and the response to β -adrenergic stimulation (Isoproterenol) in the rats when adults.

We used male Sprague-Dawley rats at different growth stages (neonatal, prepubertal and adult) using age-matched, non-stressed rats as control. Using morphometric measurements (Total cardiac mass (MCT)/body mass (MC) and ventricular mass (MV)/body mass), area and perimeter determination in cardiomyocytes and biochemical markers such as β -heavy chain myosin (β -MHC) and type I collagen, we did not found changes in all groups of study: infants, prepubertal and adults, indicating no cardiac hypertrophy or fibrosis. Finally, to evaluate the effect of *in vivo* β -adrenergic stimulation of the animals we administrated via *sc* injection, the adrenergic agonist isoproterenol (1 mg / kg body weight / day for 10 days in young adult rats) to induce hypertrophy and fibrotic response in the rats. The offspring prenatally exposed to stress presented a greater response to the drug expressed as a major hypertrophic response but not fibrotic response compared to control rats. In addition, they presented a high rate of mortality in response to the treatment strongly suggesting a higher sensitivity to the drug.

Taken together, these results suggest that sympathetic overactivation during pregnancy due to stress, affects cardiac function of the offspring in a way that strongly supports a program of cardiac function and thus a greater sensitivity to a new adrenergic stimulation in adulthood

1.- INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares son un problema de salud pública por su alta prevalencia, y porque constituyen la principal causa de muerte de la población adulta en la mayoría de los países¹. En el caso de los países en vías de desarrollo, se espera que su frecuencia siga aumentando dado por los cambios económicos y demográficos que han ocurrido en los últimos años, como lo es el control de las enfermedades infecciosas y con ello, el aumento de las expectativas de vida.^{2,3}

En Chile, las enfermedades cardiovasculares constituyen en la actualidad la primera causa de muerte, con tasas de alrededor del 28%⁴. De igual forma, como se observa en otros países, a pesar que no se aprecia un significativo aumento de su frecuencia, se ha observado que los factores de riesgo estarían presentes cada vez a edades más tempranas. De esta forma, en los últimos años se ha descubierto que las condiciones que prevalecen en el útero durante el desarrollo prenatal juegan un importante rol en el futuro desarrollo del individuo y la prevalencia hacia algunas enfermedades⁵. Así se hace necesario conocer bajo qué condiciones se producirían estos fenómenos que condicionarán a una mayor prevalencia de enfermedades cardiovasculares desde antes de nacer.

Generalidades.

1.1- “Fetal programming”

En la actualidad el origen fetal de las enfermedades que se presentan en la vida adulta, es un concepto que está firmemente basado sobre información epidemiológica, investigación clínica y estudios animales. De esta forma se ha corroborado que el principal órgano implicado dentro esta predisposición a enfermedades desde antes de nacer sería la placenta, la cual cumple variadas acciones, entre ellas: a) provee de una interface inmune entre la madre y el feto, b) funciona como transportador de nutrientes y productos de desecho entre la madre y el feto, c) es la fuente de muchos péptidos y hormona esteroidales que influyen el metabolismo y desarrollo fetal, placentario y maternal⁶. Junto con ello, cabe destacar que en la vida fetal los tejidos y órganos del cuerpo pasan a través de los llamados “periodos críticos del desarrollo” y ellos a la vez, pueden coincidir con periodos de rápida división celular en donde es importante un

óptimo funcionamiento de la placenta y con ello, del medio que provee al feto en desarrollo. Sin embargo, cuando la cascada de desarrollo orquestado de la placenta se ve interrumpida, este puede llevar a un desarrollo anormal de la vasculatura placentaria o el trofoblasto, lo que afectaría el funcionamiento óptimo de ésta.

De esta forma se ha implementado el término de “fetal programming”, el cual describe el proceso por el cual un estímulo o daño producido durante periodos críticos del desarrollo de un individuo, induce cambios permanentes que se manifiestan a largo plazo en la estructura y función fisiológica y/o en el metabolismo del individuo, siendo producto de las condiciones sub o supra óptimas de la vida intrauterina⁷. En consecuencia, “fetal programming” explicaría el complejo balance entre como la función genética es regulada por el programa nuclear genético y como es afectada por el medio ambiente externo, en particular, los nutrientes y oxígeno que son entregados por la madre, determinando la organogénesis durante los llamados periodos críticos del desarrollo y por ende, demostrando en la actualidad, el origen de alteraciones en el desarrollo hepático, neural, del páncreas, sistema reproductivo y cardiovascular.⁷

Esto se debe a que la composición corporal de la madre es uno de los factores que indica al feto como será la vida fuera del útero, siendo su composición corporal un fiel reflejo de las condiciones ambientales por un largo periodo de tiempo⁸. Sumado a esto el tiempo en el cual se desarrollan los “estímulos anormales” podría ser crítico en la consecuente función placentaria y por ende en la intensidad de “fetal programming”. Los estímulos que alteran el desarrollo de la placenta incluyen hipoxia y estatus de nutrientes maternal anormal, por lo cual la placenta podría adaptarse mediante la alteración en la expresión de transportadores y la actividad para mantener el crecimiento fetal o por regulación epigenética de la expresión de genes placentarios⁶ (ver Figura 1), por ende, el daño podría ser crítico en la consecuente función de la placenta y por lo tanto en la magnitud del “fetal programming”.

En conclusión, estos descubrimientos sugieren que alteraciones del crecimiento fetal y de la placenta tiene un efecto importante sobre el riesgo de enfermedades coronarias e infarto cerebral, en la vida adulta del individuo expuesto a un medio adverso previo a su nacimiento⁹.

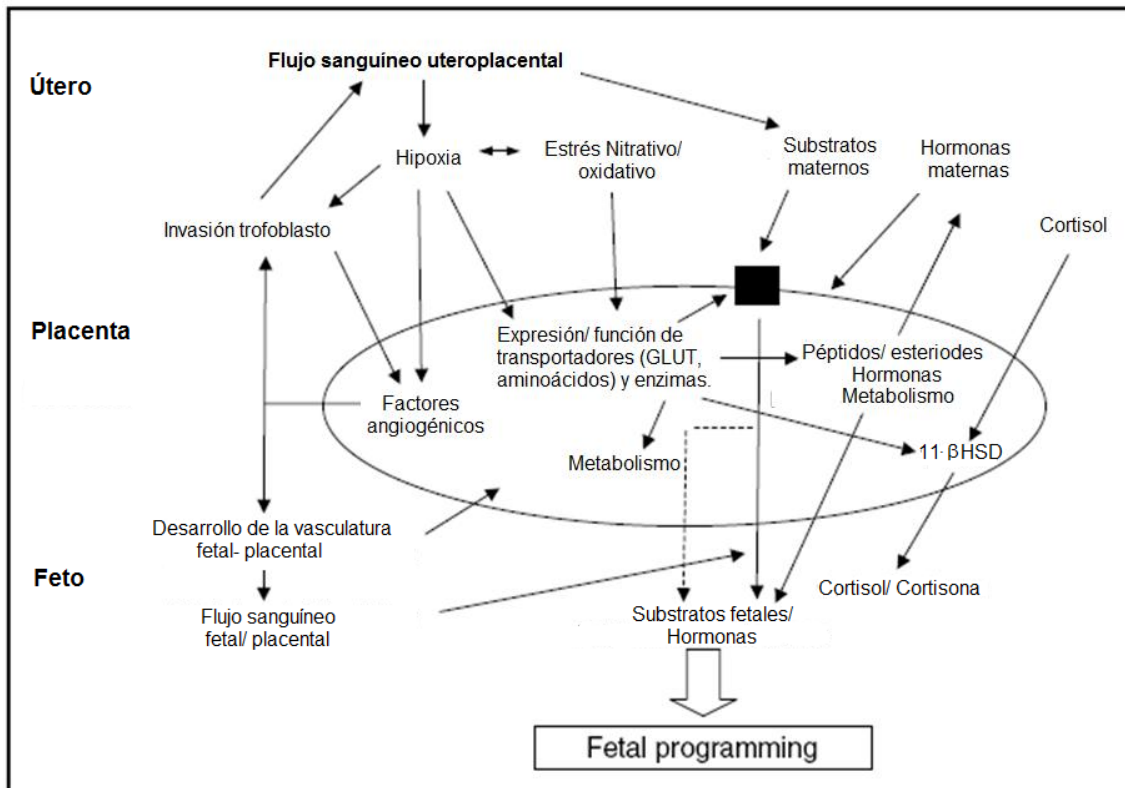


Figura 1: Respuesta adaptativa de la placenta y “fetal programming”. El flujo sanguíneo utero-placentar se encarga de administrar al feto los nutrientes y hormonas para su desarrollo intrauterino. Insultos tales como deficiencia o exceso de hormonas, nutrientes y/o alteraciones en el cortisol materno (incluyendo deficiencia de la enzima 11 β -HSD2), o bien hipoxia y/o aumento de estrés oxidativo/ nitrativo derivado de alteraciones en la actividad metabólica mitocondrial de la placenta, induciría cambios permanentes, no sólo en la estructura y función corporal del feto, sino que también en la respuesta que éste presentará a las influencias medioambientales en la adultez. De esta manera la placenta asume un rol activo en “fetal programming”. Modificado de: Myatt, L. *Placental adaptive responses and fetal programming*. J. Physiol. 2006; 572: 25- 30.

1.2- Estrés y su efecto fisiológico.

A menudo, estrés es definido como una amenaza, real o implicada a la homeostasis. De esta forma, el estrés representa un esfuerzo realizado por un organismo para adaptarse o reaccionar contra factores que tratan de quebrar el estado estacionario interno.

En relación a lo anterior la alostasis, definido como la capacidad de alcanzar estabilidad ante los cambios, como un proceso activo para mantener la homeostasis, hace uso del sistema nervioso autonómico (SNA), el eje hipotálamo-pituitaria-adrenal

(HPA), y del sistema cardiovascular, metabólico e inmunológico para proteger al organismo contra tipos de estrés, ya sean internos o externos ¹⁰. Así, se puede encontrar, que la respuesta a la alostasis puede comenzar con un incremento de las catecolaminas presentes en el sistema circulatorio desde el SNA y glucocorticoides desde la glándula adrenal. Este proceso adaptativo comienza a través de receptores intracelulares para hormonas esteroidales, receptores de membrana y segundos mensajeros para catecolaminas. Sin embargo, la mantención de este proceso adaptativo puede alterar la estructura y función de una variedad de células y tejidos. De esta forma se ha postulado en los últimos años, que el sistema fisiológico es activado por el estrés y que los mecanismos de protección- cuya función es alcanzar nuevamente la homeostasis- podrían causar daño al sistema. ¹¹⁻¹²

De esta manera, y a modo de ejemplo, observaciones epidemiológicas han mostrado que el estrés psicológico en humanos juega un importante rol en la ocurrencia de aborto habitual, menor peso de los infantes y mayor tasa de anormalidades en el embarazo. Así estos descubrimientos han enfatizado el efecto dañino del estrés durante el embarazo¹³.

1.2.1 Respuesta neuroquímica al estrés por frío

Se ha demostrado que en el caso de la exposición al frío, el mecanismo de adaptación referido a este tipo de estrés está ligado a un aumento en la activación de los nervios simpáticos periféricos en la madre, reafirmado principalmente por dos evidencias:

- 1.- Se observa un aumento de la tasa de recambio de noradrenalina en órganos con inervación simpática.
- 2.- Por otro lado se ha observado un aumento de la excreción de noradrenalina en la orina. ¹⁴

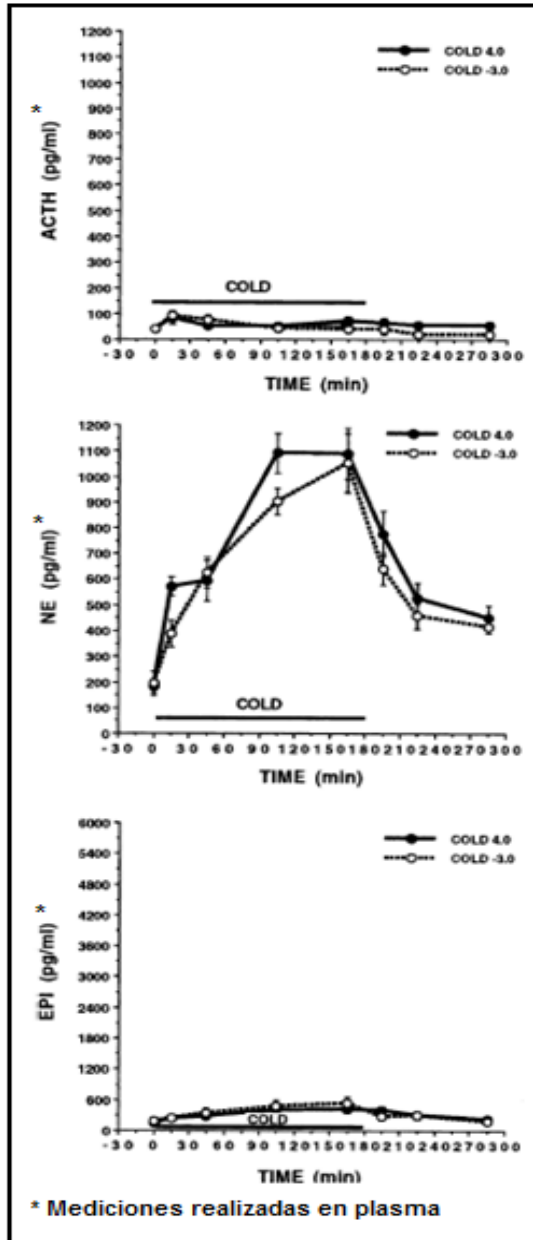


Figura 2: Efectos del estrés por frío (4 y -3°C) sobre los niveles de ACTH, NA y A. La exposición al frío en ratas Sprague-Dawley indujo una fuerte activación simpaticoadrenal, en los niveles de NA comparado con los niveles de A, produciéndose el peak de ambos, a las 3 horas de exposición al frío. Los niveles de ACTH variaron ligeramente, indicando una respuesta neuroquímica específica para este tipo de estrés. Ref: Pacak, et al. *Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity*. American Journal of Physiology. 1998; R1247-55.

De esta manera Benedict et al.¹⁴ investigaron cual era el comportamiento con respecto a la liberación de noradrenalina desde los terminales simpáticos (Figura 2), cuando una rata es estresada por frío, notando que las ratas al ser mantenidas en una pieza helada a 4°C, presentaron un rápido aumento de la noradrenalina plasmática en las primeras 2 horas alcanzando un nivel peak a las 3-4 horas (dado por un aumento de la tasa de liberación desde los terminales presinápticos), para luego notar que la concentración comenzó a caer (sugiriendo una progresiva falla de la transmisión de los mecanismos de liberación). Por otro lado, al someter a estas ratas a un segundo protocolo de estrés por frío a las 24, 48 y 72 horas después, no se observaron diferencias en la respuesta entre el primer y segundo estrés por frío, con respecto a las concentraciones plasmáticas de noradrenalina que se alcanzaron, como

también sucedió al estresar y medir nuevamente las concentraciones a los 3,4 y 7 días después del estrés inicial, mostrando nuevamente un patrón de elevación en la concentración plasmática de noradrenalina, debido a que el episodio estresor induce a las enzimas tirosina hidroxilasa y

dopamina β -hidroxilasa y por ende, las concentraciones plasmáticas de noradrenalina no presentan cambios tras un nuevo estímulo. Sumado a esto se ha descubierto que no existe aumento considerable en las concentraciones de ACTH debido al mismo agente estresor.¹⁶ (ver Figura 2)

1.2.2 Efecto estrés por frío en la descendencia

Haciendo énfasis en lo recién señalado, un estudio realizado por Guo et al.¹³, evaluó el efecto de estresar de manera crónica intermitente a ratas preñadas mediante un estrés de nado en agua fría (10 minutos a 4°C dos veces al día). De esta forma concluyó que aquellas ratas estresadas durante los días 1-11 del periodo de gestación, presentaron crías de menor tamaño a los 14 días de vida y con ello, la mayor tasa de mortalidad a los 7, 14 y 21 días postnatal, mientras que las ratas estresadas durante los días 12-21 periodo de gestación, no presentaron crías con menor peso corporal al ser comparadas con el grupo control. Finalmente el grupo estresado durante todo el periodo de gestación presentó la menor tasa mortalidad a los 7, 14 y 21 días, mientras que las estresadas entre los días 12-21, presentaron una tasa de mortalidad ligeramente mayor que el grupo control, demostrando que el estrés administrado durante la primera mitad del periodo de gestación fue dañino en las ratas preñadas, pero más aún, si el estrés era producido de manera sostenida durante todo el periodo de gestación, las ratas desarrollaron un sistema fisiológico, que no sólo les permitió sobrevivir en la vida *in utero*, sino que estuvieron mejor preparadas para el medio ambiente adverso tras nacer. De esta manera, dicha investigación dejaría en evidencia que este tipo de estrés produciría “programming” de la descendencia, dado que reafirmaría que el estrés prenatal afectaría el desarrollo postnatal, evaluado como porcentaje de muerte de la descendencia al ser estresada sólo la primera (días 1-11) o segunda (días 12-21) mitad del periodo de gestación, así como también, una mejor adaptación a los cambios ambientales tras nacer, comparando el grupo estresado durante todo el periodo de gestación con el grupo control, dado que éste presentó la mayor supervivencia, incluso que el grupo control.

1.2.3 Efecto del estrés por frío durante el embarazo y desarrollo fetal.

Según Pacak et al.¹⁶ -quienes se oponen a la afirmación citada por Selye (éste último quien postuló que el estrés induce una respuesta no específica del cuerpo ante

cualquier tipo de demanda) - afirman que el estrés por frío produce un componente noradrenérgico que predomina sin hacer caso a la intensidad del efecto estresor. Esto podría ser consistente con una respuesta neuronal noradrenérgica específica de manera de conservar el calor y la energía gastada, sin embargo, la respuesta a los niveles de ACTH fue muy pequeña, de manera que un componente no específico podría estar contribuyendo solo insignificamente en la respuesta completa.¹⁶ Específicamente en el modelo de estrés por frío crónico, se ha notado una cantidad variable de efectos en el crecimiento fetal, debido a que la capacidad de la madre de metabolizar su propia grasa almacenada es aumentada con la exposición al frío debido a la activación de los receptores adrenérgicos tipo β_3 que producen un aumento de la lipólisis en la madre, por lo tanto, se produce también como efecto secundario a esto, un aumento en la producción de glucosa hepática.¹⁷ Como es conocido que la glucosa es la primera fuente de energía en el feto en crecimiento, esto es una relación entre glucosa materna y fetal que determina en conjunto el crecimiento fetal y la viabilidad. Además cualquier efecto del estrés materno sobre el desarrollo de la descendencia podría también ser reflejado en otros impactos sobre la fisiología y metabolismo no sólo del feto, sino que también materno. De esta forma, efectos tales como aquellos sobre el sistema cardiovascular y aumento de la liberación de catecolaminas- como sucede ante una excesiva secreción de NA debido a la exposición de la madre al frío- puede resultar en una relativa hipoxia fetal, debido a la redistribución del flujo sanguíneo materno.¹⁸ Sumado a esto, el cortisol es más importante para la regulación de la diferenciación de los tejidos- un proceso que es más crítico cerca de la preparación para la vida después de nacer- especialmente para comenzar a respirar y presentar una termorregulación adecuada al nacer. Sin embargo, durante la última etapa de gestación, se han visto grandes cambios en el cortisol fetal, restringiendo el crecimiento fetal y con ello presentando un crecimiento no adecuado al nacer. Contradictorio a esto, al presentar concentraciones elevadas de glucosa durante el desarrollo fetal, el crecimiento aparentemente presenta ser el mismo, debido al efecto de la glucosa en el crecimiento fetal, no así en la maduración de los órganos¹⁹. De esta manera, estos efectos en conjunto serían los principales implicados en el desarrollo de "fetal programming", cuando la madre es sometida a un estrés ligero (esto deducido por el pequeño aumento en los niveles de ACTH), como el que se desarrolla al estresar a una ratona preñada a 4°C.

1.3- Sistema cardiovascular.

1.3.1 Características generales

El miocardio está constituido por tres tipos de componentes: Cardiomiocitos, células no musculares y la matriz extracelular que sirve de apoyo al ensamblaje de la unidad contráctil²⁰. Así, el corazón está constituido de tipos distintos de células, entre las que encontramos las células no musculares, que corresponden a un 65% del total del número de células y corresponden mayoritariamente a fibroblastos, células endoteliales y macrófagos, mientras que los cardiomiocitos, conocidos ampliamente por su función contráctil, corresponden al 35% del número total. Sin embargo, debido al tamaño que abarcan estos últimos, su presencia corresponde aproximadamente a un 80% del volumen total del tejido²¹.

Sin embargo, distintas condiciones fisiológicas y/o patológicas pueden colocar al corazón en situaciones de sobrecarga que lo llevan a desarrollar diferentes respuestas de adaptación, lo que conlleva a un cambio en la conformación celular, extracelular y funcional del corazón.

1.3.2 Remodelamiento cardiaco.

El remodelamiento del ventrículo izquierdo es el proceso por el cual el tamaño, forma y función ventricular son reguladas por factores ya sea, mecánicos, neurohormonales o genéticos. De esta manera, cuando el corazón se ve sometido a un sobrecarga de trabajo hemodinámico, la respuesta refleja que se producirá en los cardiomiocitos es aumentar de tamaño con fin de responder frente a esta mayor demanda (debido a la incapacidad de éstos para aumentar de número en el desarrollo postnatal), un proceso denominado hipertrofia cardiaca, el cual cuando está asociado con cambios en los componentes de la matriz extracelular, recibe el nombre de remodelamiento cardiaco. La respuesta hipertrófica puede ser desencadenada por mecanismos naturales de sobrecarga, por Ej., el desarrollado durante el embarazo o inducido por actividad física, más conocido como hipertrofia fisiológica; o por mecanismos de sobrecarga patológica de presión y/o volumen, secundarios, por Ej. desarrollado por hipertensión arterial, estenosis o insuficiencia valvular, miocardiopatía primaria y/o infarto agudo de miocardio, más conocido como hipertrofia patológica.²¹ (Figura 3).

La hipertrofia de los cardiomiocitos es iniciada por activación neurohormonal, estiramiento del miocardio, activación del sistema renina-angiotensina local y/o factores paracrino/

autocrinos. En relación a lo anterior, Meerson et al.²² han descrito la hipertrofia cardiaca como un

proceso de 3 etapas:

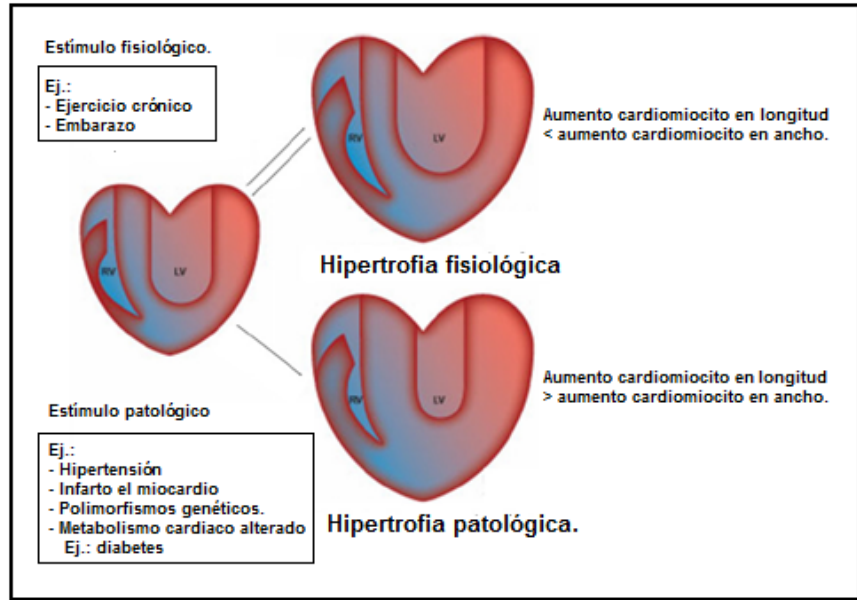


Figura 3: Hipertrofia cardiaca. Este proceso conocido como hipertrofia, es clasificado como fisiológica cuando esta ocurre en individuos sanos y no es asociado con daño cardiaco. En el caso de la hipertrofia patológica, aunque el aumento del tamaño del corazón es inicialmente un mecanismo compensatorio, la hipertrofia sostenida puede llevar a una disminución de la función del VI. Modif: Barry et al. *Molecular regulation of cardiac hypertrophy*. The international journal of biochemistry and cell biology. 2008; 40: 2023-2039.

1.- HC en desarrollo, en la cual la carga de trabajo sobrepasa al gasto cardiaco.

2.- La fase compensatoria, en la cual se ha alcanzado un equilibrio entre la carga de trabajo y la masa cardiaca, lográndose un gasto cardiaco normal

3.- La fase de insuficiencia cardiaca, en la cual se observa dilatación de la cavidad ventricular junto con la disminución progresiva del gasto cardiaco a pesar que el programa hipertrófico continúa activado.

1.3.3 Factores activados en hipertrofia cardiaca.

El aumento del tamaño de los cardiomiocitos se desencadena por estímulos externos que activan diferentes señales intracelulares que favorecen una mayor síntesis de proteínas, produciendo una duplicación de los sarcómeros que estaría determinando un incremento del tamaño de la célula. Además en la HC se re-induce el denominado

“programa genético fetal” (PGF), el cual corresponde a un grupo de genes que normalmente sólo se expresan en el desarrollo neonatal del corazón. Así, la reactivación del programa génico fetal le permite al cardiomiocito la síntesis coordinada de proteínas necesarias para que éste se ajuste a su nuevo tamaño y a las mayores demandas energéticas. La reinducción de PGF está asociado a patologías como hipertrofia excéntrica (causado por sobrecarga de volumen), provocando dilatación y adelgazamiento de la pared del corazón y concéntrica (causado por sobrecarga de presión), provocando la disminución del volumen del VI, debido al aumento del grosor de la pared del VI. Por otro lado, en la hipertrofia fisiológica no se produce tal reinducción. Entre la amplia gama de genes activados destacan la cadena pesada de β - miosina (β -MHC) y el péptido natriurético auricular (ANF), los cuales se utilizan como marcadores de HC.²³

1.3.4 Sistema adrenérgico en el desarrollo de hipertrofia cardíaca.

La potenciación de la actividad de NA induciría HC, debido a la activación de los receptores β - adrenérgicos¹⁵. Cuando NA se une a su ligando, se conduce a la activación de la adenil ciclasa (AC), con la consecuente acumulación de AMPc y la activación de la proteína quinasa A (PKA), la cual posee entre sus múltiples proteínas blanco a los canales de calcio tipo L, fosfolamban y el receptor de rianodina, con el consecuente incremento de la concentración de calcio intracelular, siendo una de las posibles vías conductoras de la HC, debido por la traslocación al núcleo de factores transcripcionales pro-hipertróficos, tales como NFAT. Dado a que la delección genética de NFAT atenúa el desarrollo de la hipertrofia, se ha postulado que la movilización de calcio intracelular es una posible vía de generación de hipertrofia ²⁴.

Por otro lado, se ha visto que un aumento del calcio citosólico está asociado con un daño funcional de muchos organelos y está fuertemente asociado con la apoptosis, razón por la cual se explicaría los daños que sufren los cardiomiocitos a nivel mitocondrial, así como también la apoptosis de éstos ante un infarto al miocardio.²³

En relación al párrafo anterior, los receptores de tipo β adrenérgicos (rescatando que el corazón posee receptores de tipo β 1) se acoplan por su parte a proteínas G del tipo Gq, los cuales al producir IP3 y diacilglicerol (DAG) a partir de fosfolipasa C, aumentan los niveles de calcio citosólico y de protein quinasa C (PKC), razón por la cual también

se ha evidenciado su implicancia en los fenómenos de aumento del tamaño de los cardiomiocitos y alteración de la expresión génica. A su vez, DAG también se ha visto implicado en el proceso de hipertrofia, debido que al inducir proteínas quinasas inducidas por mitógenos (MAPK), las cuales son serina/ treonina quinasas conformadas por diversas familias, entre las que destacan las familias de quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK). Esta última se ha relacionado con la sarcomerización evidenciada tras una inyección intravenosa con isoproterenol.⁶⁷

1.3.4.1 Modelo de isoproterenol para el desarrollo de hipertrofia cardíaca

Un aumento en el contenido de colágeno intersticial ha sido observado en muchos tipos de hipertrofia cardíaca debido a diversos orígenes^{61, 62}. De esta forma, la pérdida de cardiomiocitos ha sido sugerida como un factor que influencia el aumento en la concentración de colágeno.⁶³ En esta conexión, hormonas adrenérgicas y sus análogos también representan un potente estímulo para hipertrofia y fibrosis cardíaca^{64,65}. De esta forma, la administración del agonista β -adrenérgico isoproterenol, ha inducido hipertrofia cardíaca, necrosis de cardiomiocitos, proliferación de fibroblastos y acumulación de tejido conectivo. Asimismo, las investigaciones han indicado que hay a lo menos tres correlaciones entre el desarrollo de necrosis de cardiomiocitos y fibrosis miocárdica después de la administración de isoproterenol:

1.- La necrosis de cardiomiocitos y fibrosis se desarrollan en la misma región del corazón, siendo la mayor necrosis y fibrosis miocárdica confinadas al área del subendocardio⁶⁵ mientras que en el epicardio no se desarrolla de forma significativa esta costra de tejido fibrótico, así como tampoco se observa necrosis de cardiomiocitos.

2.- La aparición de tejido fibrótico y necrosis son cerradamente relacionadas con el tiempo de administración. Necrosis alcanza un máximo tras 12-24 hrs. de una dosis única de isoproterenol, mientras que la estimulación de la síntesis de DNA para la proliferación de fibroblastos alcanza su máximo tras 48 hrs.⁶⁶

3.- Existe una relación dosis-respuesta en relación a la necrosis y fibrosis desarrollada tras la administración de isoproterenol. Aumentos de dosis o de repeticiones del tratamiento con isoproterenol resulta en un aumento en los niveles de necrosis

observado, mayor estimulación de la síntesis de DNA y aumento de necrosis miocárdica.³³

1.3.5 Cambios en la matriz extracelular por remodelamiento cardiaco.

Por otro lado se ha evidenciado que los efectos directos del estiramiento mecánico o las sustancias liberadas por el cardiomiocito, pueden actuar sobre otras células del miocardio, como fibroblastos cardiacos, estimulando su hiperplasia y la activación de la producción de diferentes componentes de la matriz extracelular, como el colágeno. De esta forma es importante señalar que en condiciones de daño tisular, la reparación del miocardio es gatillada por la liberación de citoquinas desde los cardiomiocitos dañados y desde las células inflamatorias residentes en el tejido cardiaco. La citoquina TGF- β 1 estimula la quimiotaxis de macrófagos y fibroblastos, así como la proliferación de éstos últimos. A su vez la liberación de TGF- β 1 desde macrófagos y cardiomiocitos necrosados es también importante en la transformación fenotípica de los fibroblastos intersticiales en miofibroblastos, los cuales codifican genes para procolágeno tipo I y III, siendo los últimos responsables de la cicatrización tisular.²⁰ Por ende, acompañado del incremento del tamaño del cardiomiocito, también se produce un aumento en el número de fibroblastos cardiacos causando fibrosis y rigidez del miocardio secundaria a la generación de proteínas de la matriz extracelular.¹⁵

En resumen y haciendo hincapié en lo anteriormente expuesto, y como consecuencia del estrés por frío se produce una serie de efectos como es un aumento en la concentración de catecolaminas circulantes, hipoxia placentaria, y además a nivel cardiovascular, un aumento desmesurado relativo en el calcio intracelular y disminución en el ATP, los que en conjunto estarían actuando en la patogénesis de las alteraciones ultraestructurales inducidas en los cardiomiocitos de la madre estresada²⁶, los cuales a su vez podrían afectar el correcto desarrollo fetal.

De esta forma, enlazando los efectos de “fetal programming” debido a la exposición de la madre a un protocolo de estrés por frío- estrés que se asemejaría, dentro de ciertos rangos, al efecto del estrés laboral durante el periodo prenatal- reflejado como mayor incidencia de enfermedades cardiovasculares en la descendencia, me es posible plantear la siguiente hipótesis.

2.- HIPÓTESIS

El estrés por frío crónico intermitente, aplicado en ratas hembras durante todo el periodo de gestación, desencadena remodelamiento cardiaco en la descendencia de crías machos, mediado por “fetal programming”

3.- OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de “programming” en crías machos de ratas expuestas a estrés crónico por frío intermitente durante todo el periodo de gestación, expresado como remodelamiento del tejido cardíaco durante las diferentes etapas del crecimiento.

4.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el efecto de “programming” a nivel de remodelamiento del tejido cardíaco en crías machos (neonatas, prepúberes y adultas), debido a la exposición de la madre durante todo el periodo de gestación a estrés por frío crónico intermitente.
2. Determinar el efecto de dosis de 1mg/día/10 días de isoproterenol sobre el remodelamiento cardiaco en animales adulto jóvenes que sufrieron “programming”

5.- MATERIALES Y MÉTODOS.

5.1.- Materiales

De millipore Rabbit Colagen Type I. De Vector Laboratorios, Inc., (Burlingame, CA, EEUU) se adquirió el anticuerpo IgG de ratón anti β -MHC. De Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU) se adquirieron Isoproterenol HCl. De MERCK (Darmstadt, Alemania): Compuestos inorgánicos y orgánicos como ácidos, álcalis, sales, y solventes. De Invitrogen se obtuvo ditiotritol (DTT). De PerKin Elmer Life Sciences, Inc. (Boston, MA, EEUU): Reactivo quimioluminiscente para Western Blot (Western Lightning). De Kodak™ (Rochester, New York, USA): Film de autoradiografía y quimioluminiscencia BioMax MS. De Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU): Anticuerpos secundarios anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa. El material de plástico estéril para la obtención de homogenizados de corazón se obtuvo de Becton Dickinson (, New Jersey, USA)

5.2.- Modelo de estrés por frío crónico.

5.2.1.- Material biológico.

Se utilizaron ratas hembras vírgenes Sprague- Dawley con un peso entre 250 y 300 grs., mantenidas a 20 °C y ciclo luz: oscuridad 12:12, en donde el alimento y agua se encuentra a libre disposición. Todos los protocolos experimentales forman parte del Proyecto Fondecyt 1090036 y cuentan con la aprobación de los Comités de Ética local y de Fondecyt. Las ratas en proestro se colocaron en la misma jaula con un macho desde el medio día hasta la mañana del día siguiente, cuando se realizó un frotis vaginal para evidenciar la presencia de espermatozoides. La detección de espermatozoides se consideró como día cero de gestación. Estos animales fueron sometidos a un protocolo de estrés por frío crónico intermitente (detallado más adelante) y su progenie se distribuyó de forma aleatoria y uniforme en los diferentes cinco grupos experimentales estresados in útero, y detallados a continuación:

- 1.- Etapa neonatal: Los animales fueron sacrificados el día 4 postnatal.
- 2.- Etapa prepúber: Los animales fueron sacrificados el día 20 postnatal.
- 3.- Etapa adulta: Los animales fueron sacrificados el día 60 postnatal.

4.- Etapa adulta juvenil (45 días) tratados con PBS: los animales fueron sacrificados el día 55 postnatal.

5.- Etapa adulta juvenil (45 días) tratados con isoproterenol: Los animales fueron sacrificados el día 55 postnatal

Asimismo el grupo control se conformó con ratas de la misma edad y que se sometieron a las mismas condiciones de tratamiento, con la excepción de que fueron gestados a 20°C durante todo el período prenatal (Figura 4).

Es estrés aplicado consistió en exponer a ratas por tres horas diarias a 4°C en el bioterio de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. El día de parición de neonatos se consideró como cero y pasado 24 horas, la descendencia cumplió un día de vida. Las crías se mantuvieron junto a la madre hasta el destete, día 21 (a excepción de los grupos neonatal y prepúber). Posteriormente los machos permanecieron separados en jaulas a temperatura ambiente.

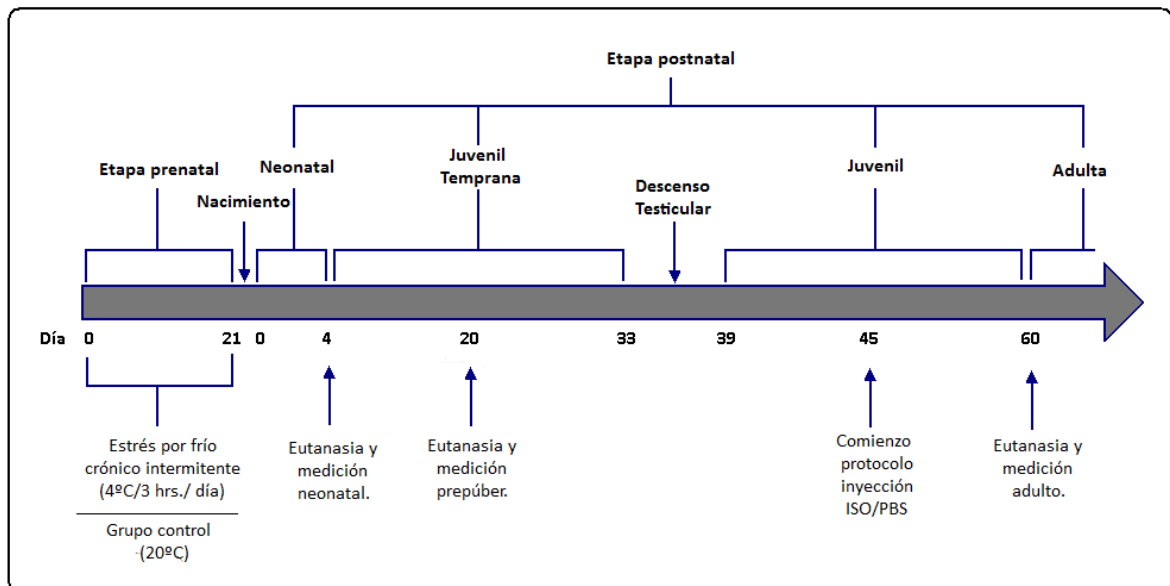


Figura 4: Protocolo grupo control y estrés por frío. Las hembras aleatorizadas fueron cruzadas y cuando el frotis dio positivo para espermatozoides, se dividió en grupos control y estrés por frío, considerando este día, como día cero. Tras la parición la descendencia de machos fue aleatorizada entre los grupos neonatos, prepúber, adulto joven y adulto, que fueron sacrificados en los días que se señalan en la figura, a excepción del grupo adulto joven que se sometió a un segundo protocolo. Para cada grupo experimental, existió un grupo control y todos los grupos tuvieron un n=6 a excepción del grupo neonato en donde n=12.

5.2.2.- Modelo de hipertrofia y fibrosis cardiaca.

Para inducir hipertrofia y fibrosis *in vivo* se usó isoproterenol (ISO) (1 mg/Kg peso)²⁷. Para ello, los animales se randomizaron en los siguientes grupos experimentales (figura 5):

1.- Grupo Estrés adulto joven ISO: a los cuales se les inyectó una dosis diaria subcutánea de (ISO) 1 mg/ Kg peso durante 10 días seguidos, siendo sacrificadas el día 11 post comienzo de protocolo de inyección.

2.- Grupo Estrés adulto joven PBS: a los cuales se les inyectó una dosis diaria subcutánea de PBS estéril 1 mL/ Kg peso durante 10 días seguidos, siendo sacrificadas el día 11 post comienzo de protocolo de inyección.

3.- Grupo Control adulto joven ISO: a los cuales se les inyectó una dosis diaria subcutánea de (ISO) 1 mg/ Kg peso durante 10 días seguidos, siendo sacrificadas el día 11 post comienzo de protocolo de inyección.

4.- Grupo Control adulto joven PBS: a los cuales se les inyectó una dosis diaria subcutánea de PBS estéril 1 mL/ Kg peso durante 10 días seguidos, siendo sacrificadas el día 11 post comienzo de protocolo de inyección.

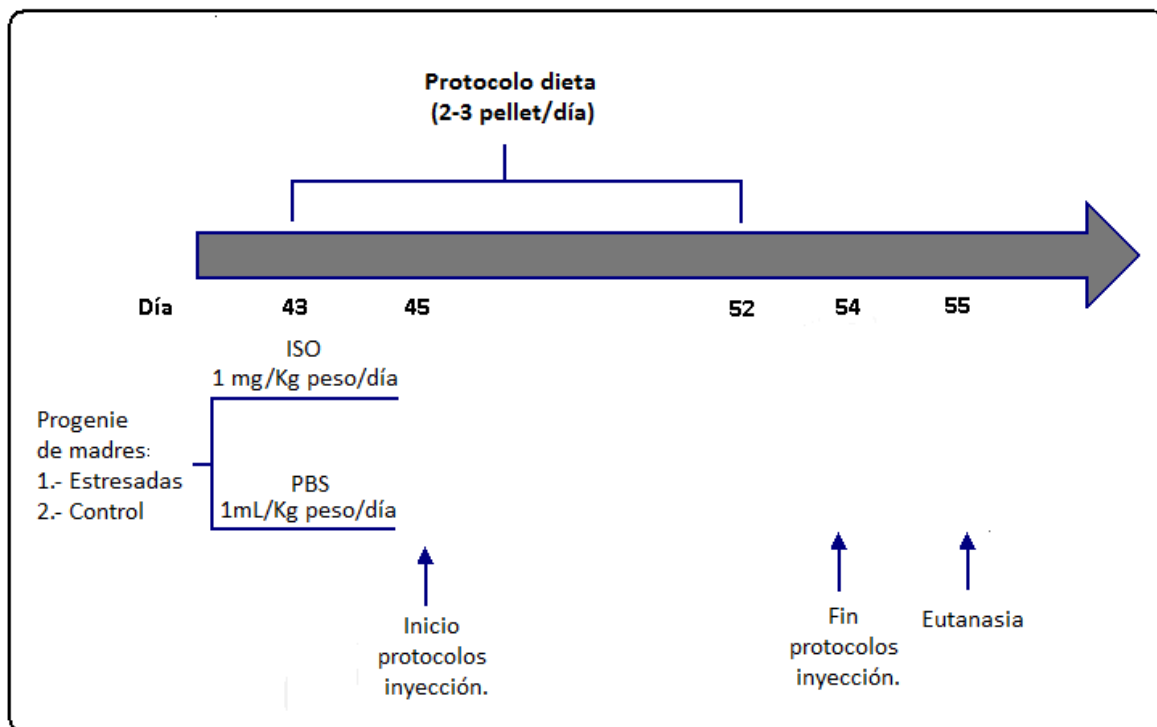


Figura 5: Protocolo inyección isoproterenol 1 mg/Kg peso/ día. La descendencia de machos de los grupos tanto control como estrés, se dividió en dos subgrupos, vale decir, cada subgrupo de ratas sometidas al protocolo de inyección de isoproterenol presentó un subgrupo de ratas control a las cuales se les inyectó 1 mL PBS/ Kg peso. Todos los grupos fueron sometidos a tratamiento por 10 días, siendo sacrificados 24 hrs después de la última dosis. Cada grupo presentó un n=6.

Con respecto a la comida, las ratas se sometieron en un protocolo de dieta²⁸ que comenzó el día 43 postnatal, siendo el día 45 postnatal el inicio de los respectivos protocolos de inyección. Este protocolo de dieta consistió en 2- 3 pellet /día dando uno en la mañana, otro al medio día y otro en la tarde- noche entre los días 43-46 post natal y uno en la mañana y uno en la tarde-noche entre los días 47- 52 postnatal. Entre los días 53 hasta la fecha de sacrificio, el día 55 postnatal, la comida fue dada *ad libitum*.

5.2.3.- Obtención de muestras.

Los animales se sacrificaron por decapitación y se procedió a la toma de muestra del tejido cardíaco. El corazón se extrajo, se lavó con suero fisiológico para eliminar los excesos de sangre y se pesó en el siguiente orden:

- 1.- Se pesó el corazón limpio (sin restos de arterias y/o venas) con aurículas
- 2.- Se pesó el corazón limpio, luego de haber removido las aurículas.
- 3.- Se pesó el ventrículo derecho, luego de separarlo cuidadosamente del ventrículo izquierdo.
- 4.- Se pesó el ventrículo izquierdo solo.

Todas las muestras se obtuvieron de la misma forma, a excepción de las muestras provenientes de ratas neonatas, en donde sólo se realizaron sólo los pasos 1 y 2 de pesada.

Posteriormente, se realizaron 3 cortes transversales y de igual tamaño en el ventrículo izquierdo (VI). Las porciones del ápice y base se separaron y congelaron a -80°C hasta el posterior y respectivo procesamiento. Por otro lado, la zona media del VI se fijó en Bouin alcohólico 95% (formalina 25%, ácido pícrico saturado 75%) y ácido acético 5% a 4°C por 24 horas. Los tratamientos anteriores fueron similares para todas las muestras a excepción del grupo neonatal, en donde debido al tamaño del corazón se necesitó del doble del número de muestras en relación a los otros grupos. De esta forma la mitad ($n=6$) del número total de corazones neonatales utilizados ($n=12$), se congelaron a -80°C (luego de sacar las aurículas) hasta el posterior y respectivo procesamiento. La otra mitad de las muestras de los corazones neonatos utilizados ($n=6$), se fijaron en Bouin alcohólico, al igual que la zona media del resto de las muestra de los diferentes grupos experimentales, habiendo previamente extraído las aurículas de dichas muestras.

5.2.4.- Evaluación de la hipertrofia y fibrosis ventricular.

El grado de hipertrofia cardiaca (HC) se cuantificó por la relación entre:

- ⊕ La masa cardíaca total (MCT) y la masa corporal (MC)
- ⊕ La masa ventricular (MV) y la masa corporal (MC)
- ⊕ La masa ventricular derecha (MVD) y la masa cardíaca total (MCT)
- ⊕ La masa ventricular izquierda (MVI) y la masa cardíaca total (MCT).
- ⊕ Aumento de área y perímetro del cardiomiocito v/s grupo control.
- ⊕ Los niveles proteicos de β - MHC

El grado de fibrosis se cuantificó por

- ✦ Niveles proteicos de colágeno tipo I y tinción con Tricromo Masson

5.2.5.- Análisis morfológicos y morfométricos del cardiomiocito.

La porción media del ventrículo izquierdo (fijada en Bouin alcohólico), se deshidrató a 4°C por 24 horas, para luego retirar los excesos de éste por medio de 3 lavados de 10 minutos cada uno, con alcohol 70°, para finalmente dejar el corte embebido en parafina al 4%. Se tomaron cortes de 5 µm de grosor y se tiñeron con hematoxilina- eosina y tricromo masson para después ser examinados en un microscopio de luz.

Con el fin de observar sus características morfológicas generales se utilizó la tinción con hematoxilina eosina y con ésta se midió el área y perímetro de los cardiomiocitos, de acuerdo a lo descrito por Nakamura y col.²⁹ Brevemente, se realizaron cuatro cortes seriados de 5 µm de espesor de cada ventrículo y se analizaron los cardiomiocitos (Figura 7) en la zona subendocárdica (señalado con color naranja en la figura 6). Sólo los cardiomiocitos que presentaron un núcleo definido fueron analizados (flechas verdes en Figura 7). En cada corte se seleccionaron dos campos- tal como se señala mediante achurado en la figura 6 - con la finalidad de cubrir la totalidad del área subendocárdica.

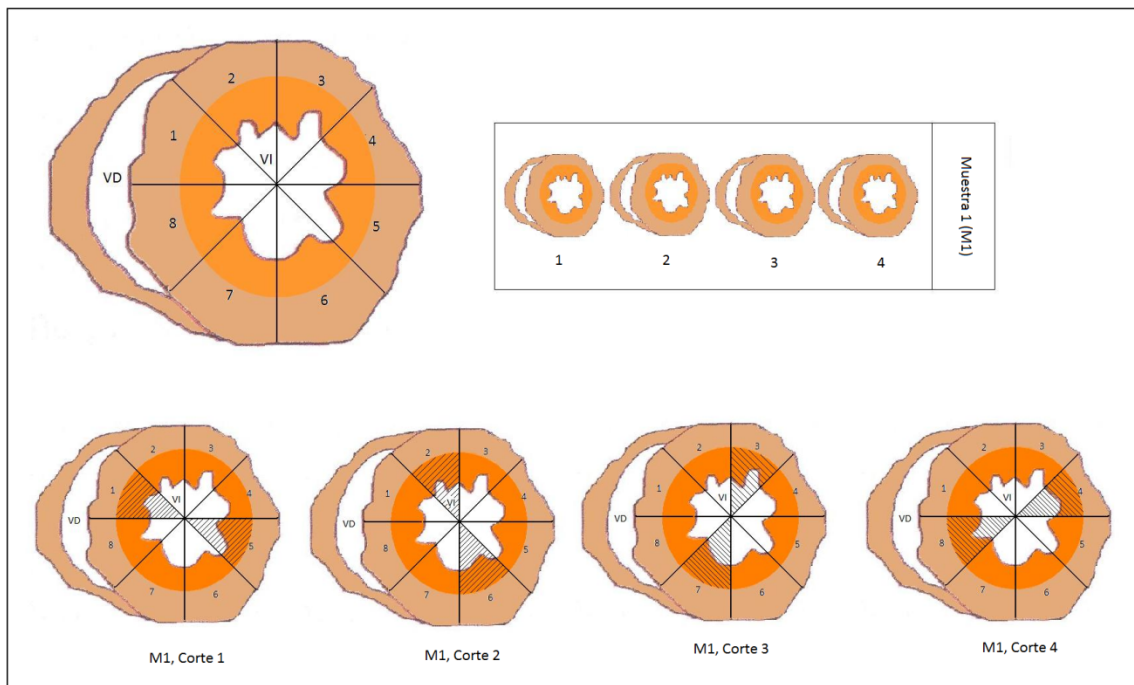


Figura 6: Esquema representativo de la metodología de morfometría de cardiomiocitos *in vivo*.

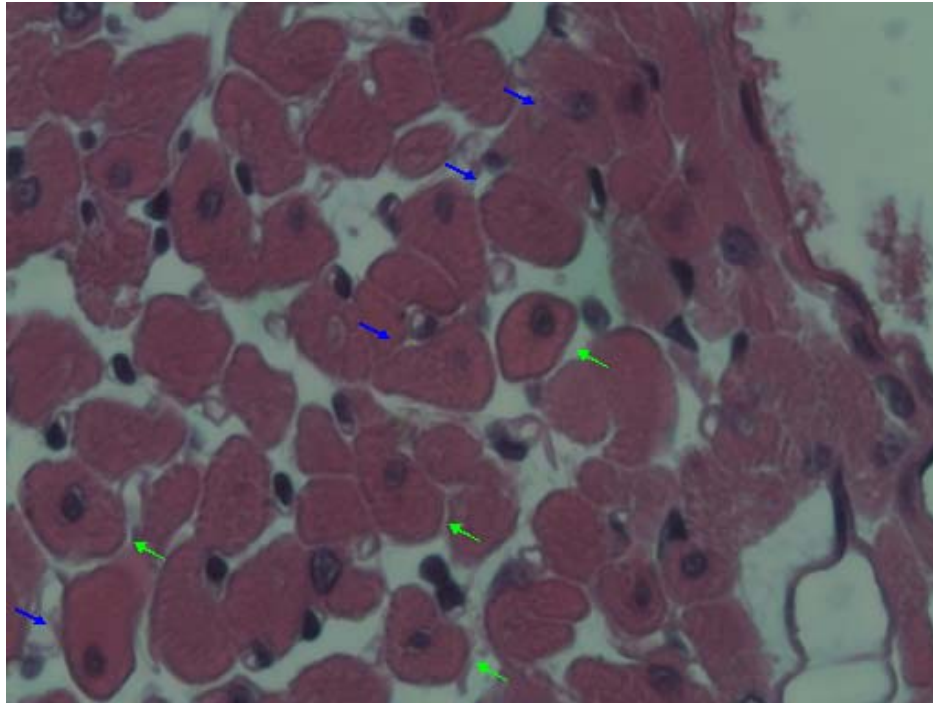


Figura 7: Individualización de cardiomiocitos. Indicado con flechas verdes, se señalan ejemplos de cardiomiocitos que fueron aptos para ser medidos, mientras que con flechas azules, se señalan aquellos que fueron descartados para ser medidos, por no presentar un perímetro o núcleo claramente definido.

Las imágenes de las células se analizaron con un aumento óptico de 100x/1.25 oil ∞/-/FN22 y se capturaron mediante una cámara de video (Olympus U- TV0.5XC-3, 3.2 M CMOS Camera) fijada a un microscopio (Olympus CX31 Plan C N) y proyectadas a un monitor, mediante un software de análisis Micrometrics®, en el cual se fijó la imagen. Posteriormente se calculó y registró el área de superficie y el perímetro de cardiomiocitos mediante el software ImageJ®. Todos los análisis se realizaron, considerando al menos, 100 células por corazón. Para la evaluación del área y perímetro celular, la medición de cada célula se ingresó como unidad individual al análisis estadístico.

5.2.6.- Obtención de extractos proteicos de ventrículo izquierdo.

Se prepararon extractos proteicos de ventrículo, con el fin de poder determinar los niveles de expresión de proteínas β -MHC y colágeno tipo I. Para ello, el tejido se descongeló, pesó y homogenizó en un volumen del 500 μ l de tampón de homogenización (deoxicolato de sodio 5%, NaVO_3 25 mM, PMSF 10 mM, aprotinina 1

mg/ml, leupeptina 0,1 mg/ml, pepstatina 5 mg/ mL) mediante el uso de Ultraturrax T25 (Janke & Kunkel, IKA- Labortechnik). El homogenizado se traspasó a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 1.200xg por 15 min a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se procedió a medir la concentración de proteínas por el método de Lowry.

5.2.7.- Cuantificación de proteínas.

Se cuantificaron las proteínas de todas las muestras de corazón homogenizadas por el método de Lowry.

Luego se preparó una solución stock de 2 µg/µl de cada muestra en tampón de denaturación 4x (Glicerol 87%, Tris-HCL 10 mM pH 6.8, β- mercaptoetanol 27%, SDS 20%, azul de bromofenol 0.04%) y tampón de lisis RIPA como disolvente para ser almacenadas posteriormente a -20° C hasta su uso.

5.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida

La separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. Para todos los geles realizados para extractos proteicos de ventrículo izquierdo, se cargaron 40 µg de proteínas. Tanto en la determinación de niveles de β – MHC como Colágeno tipo I, se utilizó un gel separador al 8% y para ambos casos el gel concentrador fue al 5%. La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 100 V en tampón de electroforesis 1x (Tris base 0,325%, glicina 1,44% SDS 0,1 p/V)

5.3.1 Electrotransferencia de proteínas.

Las proteínas se electrotransfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad) a 400 mA durante 120 min en tampón de transferencia (Tris base 0,325%, glicina 1,44%, metanol 20 %v/v).

5.3.2. Western blot

Las membranas se bloquearon con tampón de bloqueo que contiene tampón TBS 1x (Tris base 0,05 M, NaCl 0,5 M, pH 7.4), Tween- 20 0,1% y leche descremada 5% p/v, durante 60 min a temperatura ambiente (25°C) y posteriormente se incubaron a 4°C y con agitación suave durante toda la noche con los anticuerpos primarios β-MHC y

Colágeno tipo I, ambos utilizados a una dilución 3:1000 en tampón de incubación (TBS 1X, Tween-20 0,1% y leche descremada 5% p/v).

Posterior a la incubación, las membranas se lavaron 3 veces por 10 min con TBS 1x- Tween 20 0.1% y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo anti-IgG de conejo y ratón conjugado con peroxidasa según correspondiese, a un título de 1:5000 en tampón de bloqueo TBS 1x- Tween 20 0.1%. Posteriormente, las membranas se lavaron 3 veces por 10 minutos con TBS 1x- Tween 20 0.1% e incubaron durante 1 min con el sustrato quimioluminiscente "Western Lightning", se ubicaron en los cassettes y se expusieron a las películas autoradiográficas Kodak-BioMax MS en completa oscuridad.

A continuación estas películas se digitalizaron y las imágenes se analizaron mediante densitometría utilizando los softwares Adobe® Photoshop® 7.0 y UN-SCAN-IT gel (Utah, USA). Finalmente para desprender los anticuerpos, las membranas se incubaron por 1 h en una solución de rojo Ponceau (rojo Ponceau 2%, TCA 30%, ácido sulfosalicílico 30%) y se fotografiaron de manera de utilizar la tinción con rojo de Ponceau como control de carga. Luego se lavaron con TBS 1x- Tween 20 0.1% hasta completa remoción de este reactivo. Al finalizar este tratamiento, el proceso se reanudó desde el bloqueo.

5.4 Análisis estadístico.

Los resultados se expresaron como promedio \pm SEM (n=6 animales independientes). Para analizar datos de dos grupos distintos se utilizó la prueba T-Student no pareada. Por otra parte, para datos de más de dos grupos se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y el post-test de Tuckey para determinar la significancia estadística. Se determinó como nivel de significancia un $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Efecto de “Fetal Programming” en el remodelamiento del tejido cardíaco en crías machos (neonatos, prepúberes y adultos).

6.1.1 Comparación peso corporal en diferentes edades.

En la figura 8 se muestra el peso de ratas neonatas, prepúberes y adultas control versus el grupo estresado de las mismas edades. El análisis dejó en manifiesto un aumento significativo del peso de las ratas neonatas provenientes de madres estresadas (9.81 ± 0.647 vs 11.91 ± 0.213 , $p = 0,01$ respectivamente). Este aumento del peso corporal de las ratas provenientes de madres estresadas se mantiene hasta el crecimiento prepupal (45.70 ± 0.830 vs 49.87 ± 1.122 , $p = 0,05$) y finalmente desaparece cuando las ratas alcanzan la adultez (332.5 ± 9.633 vs 344.1 ± 9.066).

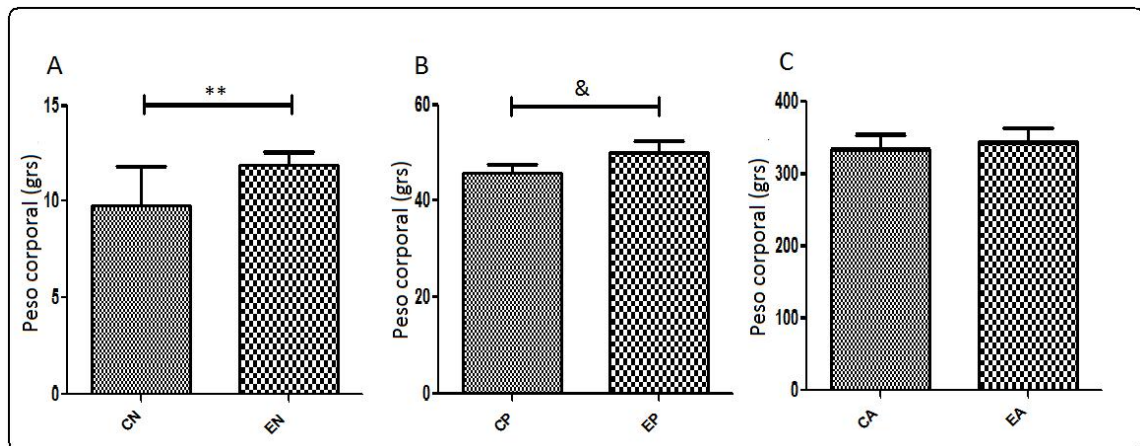


Figura 8: Peso corporal entre ratas controles y estresadas. Ratas machos neonatas, prepúberes y adultas, tanto control como estresadas. A: Los resultados se presentan como promedio \pm SEM ($n=10$) $** p < 0.01$ neonatos control vs estrés. B: Los resultados se presentan como promedio \pm SEM ($n=6$) $\& p < 0.05$ prepúberes control vs estrés. C: Los resultados se presentan como promedio \pm SEM ($n=6$) adultas, control vs estrés. Abreviaturas: CN: Control Neonato; EN: Estrés Neonato; CP: Control Prepúber; EP: Estrés Prepúber; CA: Control Adulto; EA: Estrés adulto.

6.1.2 Comparación parámetros morfométricos.

En las figuras 9A y 9B podemos evidenciar las comparaciones de MCT/MC (masa cardiaca total/masa corporal) y MV/MC (masa ventricular/ masa cardiaca), en donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control vs estrés en ninguna etapa del desarrollo, evidenciando que la descendencia de ratas estresadas no presentó hipertrofia cardiaca, ni desarrolló ésta durante al crecimiento.

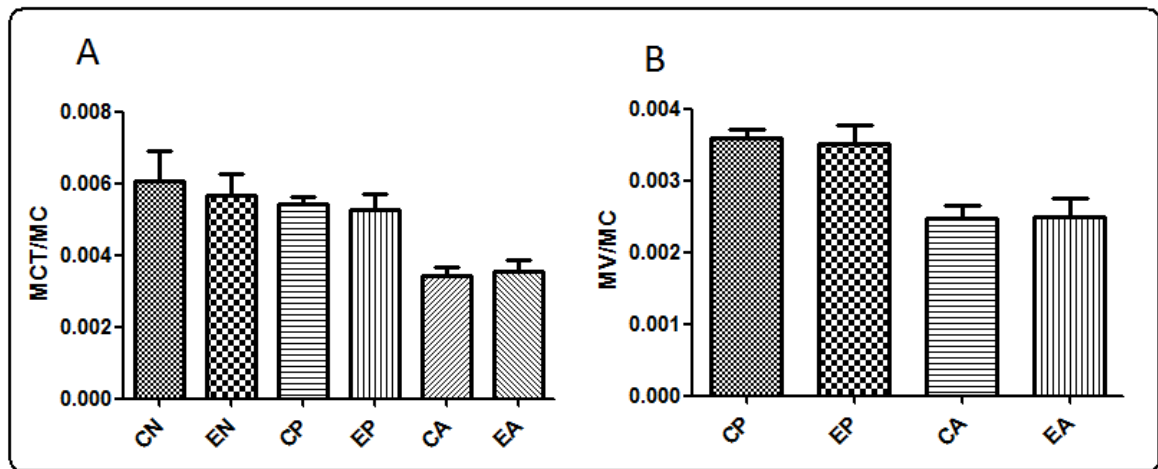


Figura 9: Comparación MCT/ MC y MV/ MC entre ratas sin tratamiento. Ratas machos prepúberes y adultas, se randomizaron entre los diferentes grupos control y estrés. A: Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6). B: Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6). Abreviaturas: CN: Control Neonato; EN: Estrés Neonato; CP: Control Prepúber; EP: Estrés Prepúber; CA: Control Adulto; EA: Estrés adulto.

6.1.3 Comparación área y perímetro de cardiomiocitos.

Se procedió a evaluar los cambios de área y perímetro de cardiomiocitos en ratas prepúberes y adultas grupo control versus grupo estrés. En la figura 10, se muestran microfotografías de cortes histológicos teñidos con hematoxilina- eosina, en donde es posible apreciar que no existen variaciones apreciables en la forma de cardiomiocitos provenientes de ratas prepúberes y adultas ya sean del grupo control o estrés.

Por otro lado, se midió el área (figura 11A) y perímetro (figura 11B) de los cardiomiocitos provenientes de ratas control y estresadas, evidenciando que no existen

diferencias estadísticamente significativas al comparar a ratas prepúberes o adultas (control vs estrés).

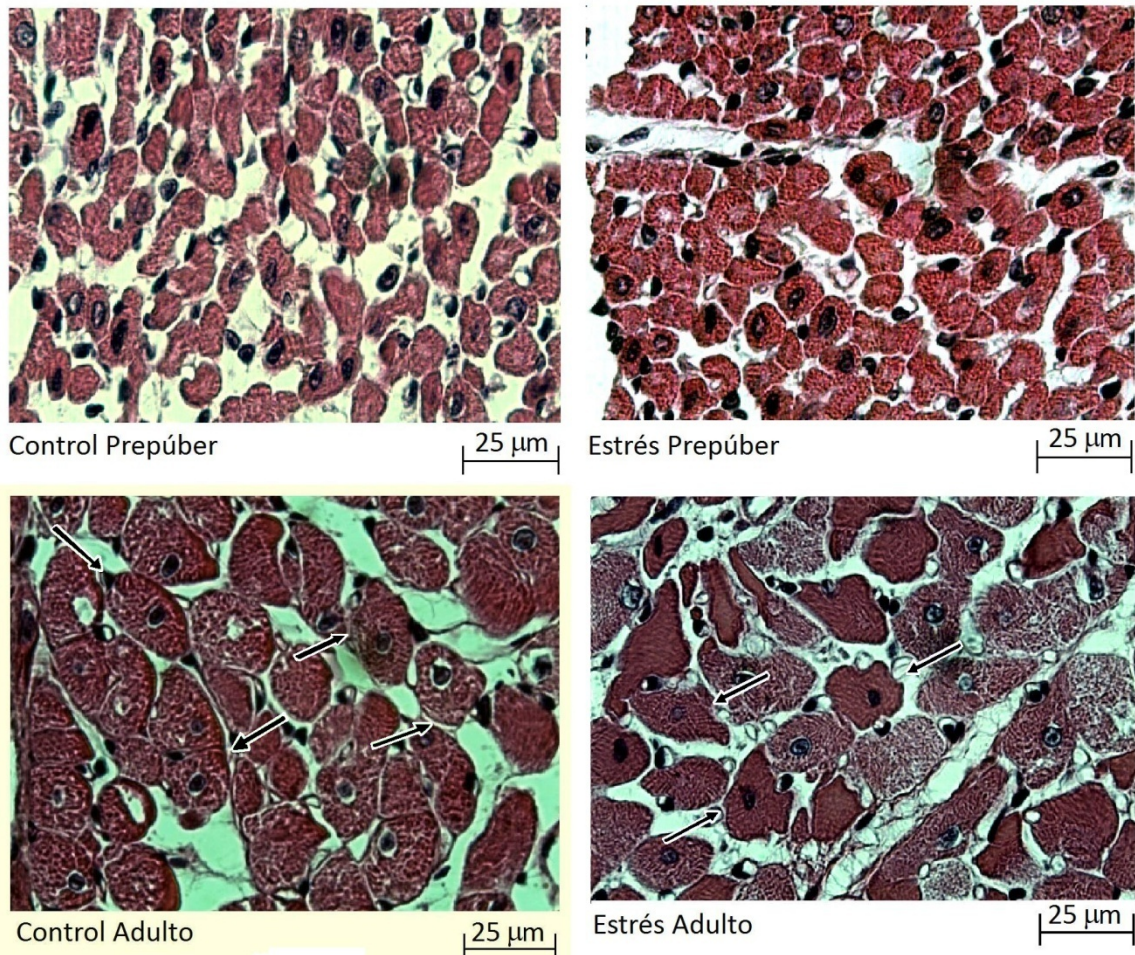


Figura 10: Microfotografías de cortes de corazón de ratas prepúberes y adultas provenientes de madres control y estresadas. En las fotografías se ejemplifica mediante flechas negras los cardiomiocitos de ratas adultas que fueron medidos, tanto aquellos provenientes de ratas control como estresadas. Para todas las mediciones n=6.

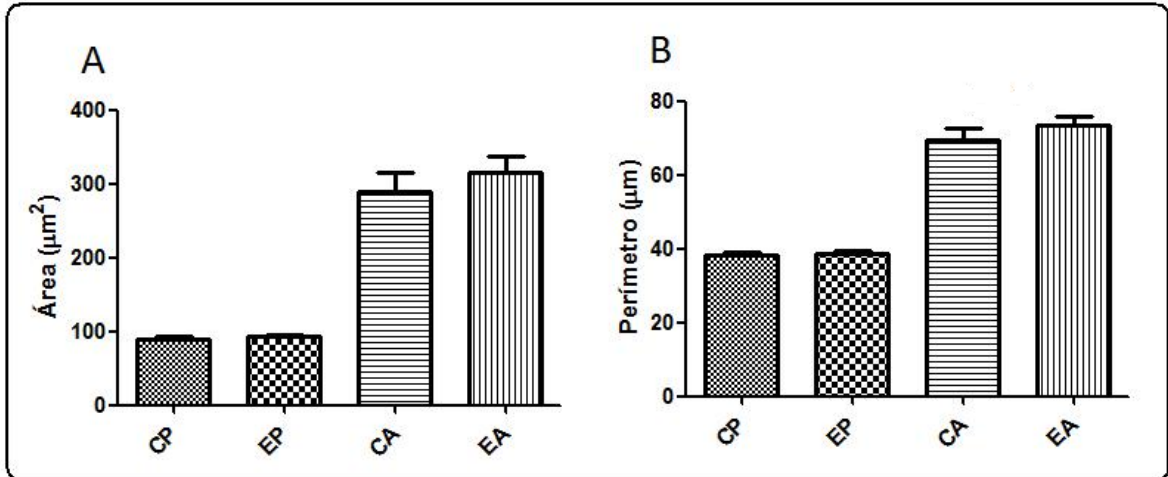


Figura 11: Cuantificación área y perímetro cardiomiocitos. A: Se midió área de cardiomiocitos en grupos de ratas prepúberes y adultas, control y estrés que no recibieron tratamiento de ISO. Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6). B: Se midió perímetro de cardiomiocitos en grupos de ratas que no recibieron tratamiento de ISO. Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6). Abreviaturas: CN: Control Neonato; EN: Estrés Neonato; CP: Control Prepúber; EP: Estrés Prepúber; CA: Control Adulto; EA: Estrés adulto.

6.1.4 Cuantificación proteína β -MHC y colágeno tipo I por Inmuno Western Blot.

En la figura 12 y 13 se muestra una imagen representativa para el IWB para la proteína β -MHC y colágeno tipo I, respectivamente; en donde se aprecia que no hay diferencias en los niveles de ambas proteínas en ratas neonatas y prepúberes. Sin embargo, en éstas mismas imágenes se puede apreciar que los IWB en ratas adultas existe aumento de la proteína β -MHC en ratas control adultas vs estrés adultas (8.738 ± 1.960 vs 2.562 ± 0.44 , $p = 0,05$), pero no así para Colágeno tipo I.

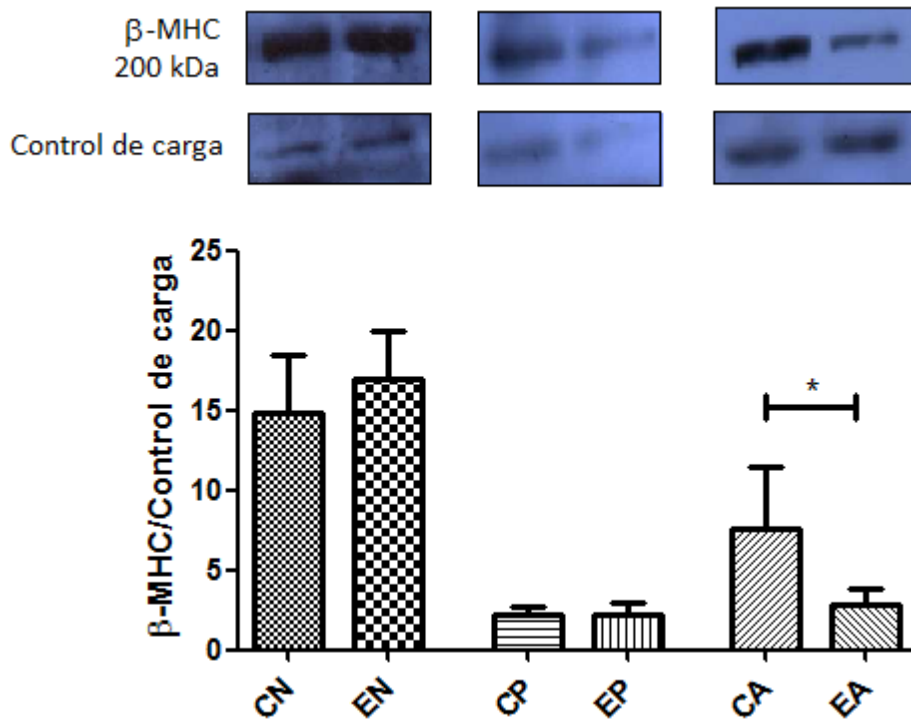


Figura 12: Cuantificación proteína β -MHC entre ratas sin tratamiento. Se cuantificó la cantidad de proteína β -MHC entre los grupos de ratas neonatas, prepúberes y adultas por IWB, tanto control como estrés. En la figura se muestra una imagen representativa de cada IWB. Los resultados se presentan como promedio \pm SEM ($n=6$) para cada comparación. * $p < 0.05$, CA vs EA. Abreviaturas: CN: Control Neonato; EN: Estrés Neonato; CP: Control Prepúber; EP: Estrés Prepúber; CA: Control Adulto; EA: Estrés adulto.

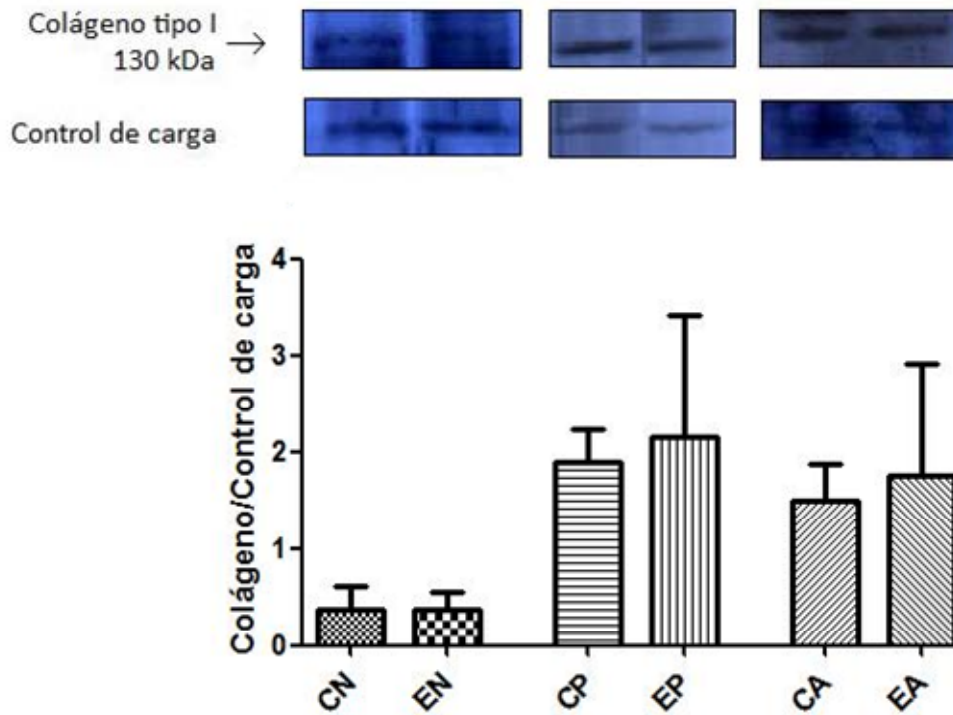


Figura 13: Cuantificación proteína Colágeno tipo I. Se cuantificó la cantidad de proteína colágeno tipo I entre los grupos de ratas neonatas, prepúberes y adultas, tanto control como estrés por IWB. En la figura se muestra una imagen representativa de cada IWB. Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6) para cada comparación. Abreviaturas: CN: Control Neonato; EN: Estrés Neonato; CP: Control Prepúber; EP: Estrés Prepúber; CA: Control Adulto; EA: Estrés adulto.

6.2 Efecto de una dosis diaria (1 mg) de isoproterenol durante 10 días sobre el remodelamiento cardiaco en animales adultos que sufrieron “Fetal Programming”

En la figura 14, se encuentra la curva de Kaplan Mayer, que resume los resultados encontrados tras someter a ratas controles y estresadas a dosis de ISO, en donde se produjo una muerte del 50% en la descendencia de ratas estresadas ISO vs un 100% de supervivencia tanto en ratas controles ISO, como en estresadas y no estresadas sin tratamiento (PBS), vale decir, los correspondientes grupos controles. Cabe destacar, que la mayor cantidad de muertes se produjo en los primeros 3 días de tratamiento, mientras que no hubo variaciones en el porcentaje de supervivencia luego de administrarse la 4^a dosis de ISO en la descendencia de ratas estresadas.

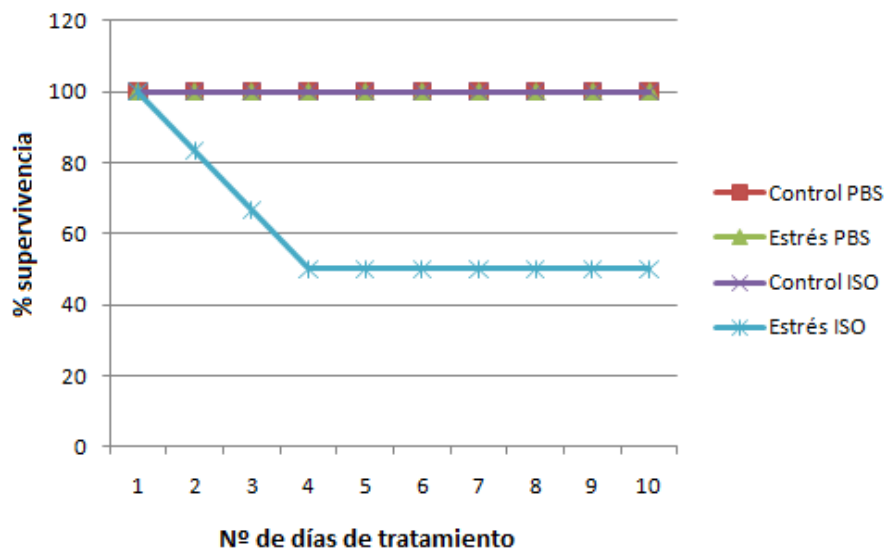


Figura 14: Mortalidad de ratas tratadas con ISO, curva Kaplan-Mayer. En el gráfico se refleja el porcentaje de supervivencia de ratas adulto joven tras sus correspondientes tratamientos. En éste, se puede apreciar una muerte del 50% entre ratas estresadas que se trataron con isoproterenol 1 mg/Kg peso/día/ 10 días. Los demás grupos presentaron un 100% de supervivencia frente a los respectivos tratamientos.

6.2.1 Parámetros morfométricos.

Los resultados de los parámetros morfométricos se pueden apreciar en las figuras 15A y 15B, en donde se aprecia inicialmente que al comparar la razón de masa cardiaca total (MCT)/ peso corporal (MC) en la figura 15A, en ratas de la misma condición (control o estrés) tratadas con ISO versus tratadas con PBS, si presentaron diferencias estadísticamente significativas (0.0049 ± 0.0001 control ISO vs 0.003 ± 0.0001 control PBS, $p=0,001$ y 0.0053 ± 0.0001 estrés ISO vs 0.0031 ± 0.0001 estrés PBS, $p=0,001$), lo que indicaría que el tratamiento con ISO fue efectivo como inductor de hipertrofia cardiaca. Junto con ello se analizó diferencias entre los grupos tratados con ISO, en donde es posible apreciar que la descendencia de ratas estrés ISO presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar MCT/MC respecto de las ratas no estresadas ISO (0.0049 ± 0.0001 Control ISO vs 0.0053 ± 0.0001 Estrés ISO, $p=0,01$) lo que reflejaría una sensibilidad mayor de las ratas descendientes de madres estresadas ante una nueva sobrecarga adrenérgica. Asimismo al comparar los correspondientes grupos controles PBS (tanto control como estrés) no hubo diferencias en cuanto a éste parámetro.

Con respecto al parámetro morfométrico masa ventricular (MV)/ masa corporal (MC) detallado en la figura 15B, se observa que nuevamente se encontraron diferencias entre ratas tratadas con ISO (0.0035 ± 0.0001 Control ISO vs 0.0038 ± 0.0001 Estrés ISO, $p= 0,05$) y no así entre ratas tratadas con PBS, lo que en conjunto demuestra que el tratamiento con ISO es efectivo como inductor de hipertrofia y además se apreciaría un mayor aumento de hipertrofia cardiaca, vale decir mayor sensibilidad, por parte de la descendencia de ratas estresadas.

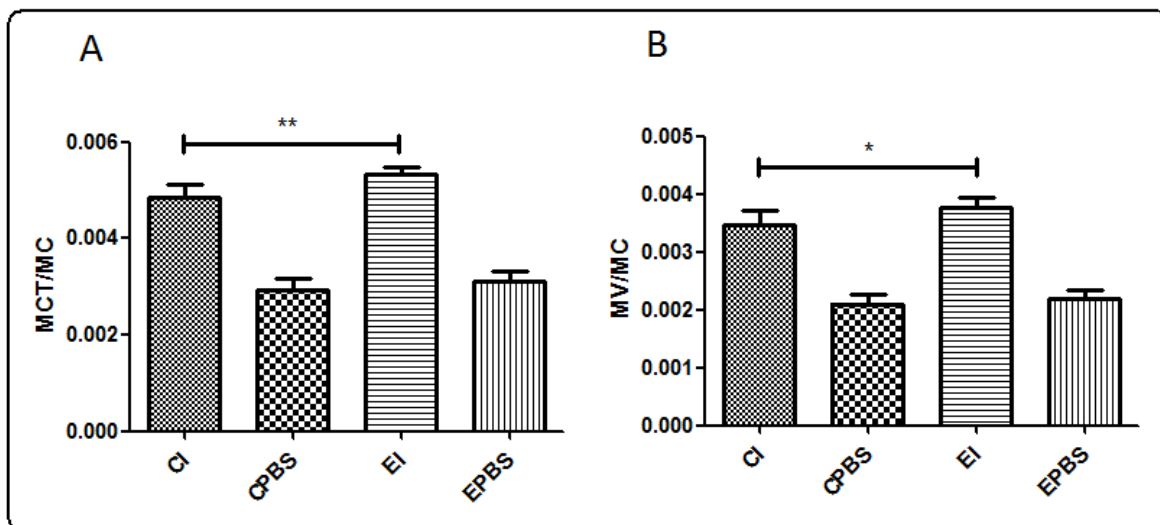


Figura 15: Comparación MCT/MC y MV/MC en ratas adulto joven tratadas con/sin ISO. Ratas machos adulto jóvenes, se randomizaron entre los diferentes grupos que recibieron dosis de PBS o ISO (separadas previamente entre control y estresadas). A: Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6). ** p< 0.01 CI vs EI; &&& p< 0.001 CPBS vs CI y EI; ### p< 0.001 EPBS vs CI y EI. B: Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6). * p< 0.05 CI vs EI; &&& p< 0.001 CPBS vs CI y EI; ### p< 0.001 EPBS vs CI y EI. Abreviaturas: CI: Control Adulto Joven ISO; EI: Estrés Adulto Joven ISO; CPBS: Control adulto joven PBS; EPBS: Estrés Adulto Joven PBS.

6.2.2 Medición área y perímetro cardiomiocitos de ratas adulto jóvenes tratadas.

En la figura 16 se observa las microfotografías representativas de cortes de corazón teñidos con hematoxilina- eosina de ratas adulto joven tanto control como estrés que recibieron tratamientos de PBS o ISO. En estos se puede apreciar un exacerbado crecimiento de los cardiomiocitos de las ratas tratadas con ISO al compararlos con sus correspondientes controles PBS, así como también, se puede observar que no existen diferencias aparentes en tamaño en cuanto a las ratas tratadas con PBS, pero por el contrario, se observan diferencias significativas en tamaño al comparar entre ratas control ISO (CI) y estrés ISO (EI).

Además se midió área y perímetro de cardiomiocitos de los 4 grupos experimentales en donde se encontró que en cuanto a área (figura 17A) existe un aumento significativo en ratas descendientes de madres estresadas tratadas con ISO al comparar con el grupo control ISO (336.8 ± 8.411 control ISO vs 462.6 ± 19.23 estrés ISO, $p= 0,001$), mientras que en los grupos de ratas tratadas con PBS no se encontraron diferencias, pero al comparar con los respectivos grupos tratados con ISO evidenciaron nuevamente que el tratamiento con ISO indujo hipertrofia del cardiomiocito (336.8 ± 8.411 Control ISO vs 230.3 ± 8.267 Control PBS, $p = 0, 001$ y 462.6 ± 19.23 Estrés ISO vs 224.0 ± 9.068 Estrés PBS, $p= 0,001$), observándose además un aumento mayor entre los cardiomiocitos de ratas provenientes de madres estresadas al ser tratadas con PBS vs ISO, vale decir,:

[Tamaño de cardiomiocitos rata tratada con ISO - Tamaño cardiomiocito rata tratada con PBS= aumento de cardiomiocito por tratamiento]

238.6 ± 21.26 aumento en ratas estresadas vs 106.5 ± 11.79 aumento en ratas control, lo que evidenciaría un efecto exacerbado por parte de las ratas descendientes de madres estresadas frente al tratamiento con ISO.

En cuanto a la medición de perímetro (figura 17B) se encontraron resultados similares a los encontrados en la medición de área, dado que se encontró un aumento significativo en el perímetro de los cardiomiocitos de ratas descendientes de madres estresadas tratadas con ISO en comparación a ratas control ISO (85.56 ± 1.713 Estrés

ISO vs 72.75 ± 0.877 Control ISO, $p=0,001$), y no se encontraron diferencias entre las ratas tratadas con PBS. Nuevamente se evidenció un aumento de la hipertrofia al comparar ratas de la misma condición (control o estrés) que recibieron ISO v/s PBS (72.75 ± 0.877 Control ISO vs 62.04 ± 1.134 Control PBS, $p= 0,001$ y 85.56 ± 1.713 Estrés ISO vs 61.67 ± 1.257 Estrés PBS, $p=0,001$) y a su vez, se encontró un aumento en el perímetro entre las ratas estresadas, en comparación a ratas controles (23.89 ± 2.125 aumento perímetro entre ratas estresadas vs 10.71 ± 1.434 aumento de perímetro entre ratas control).

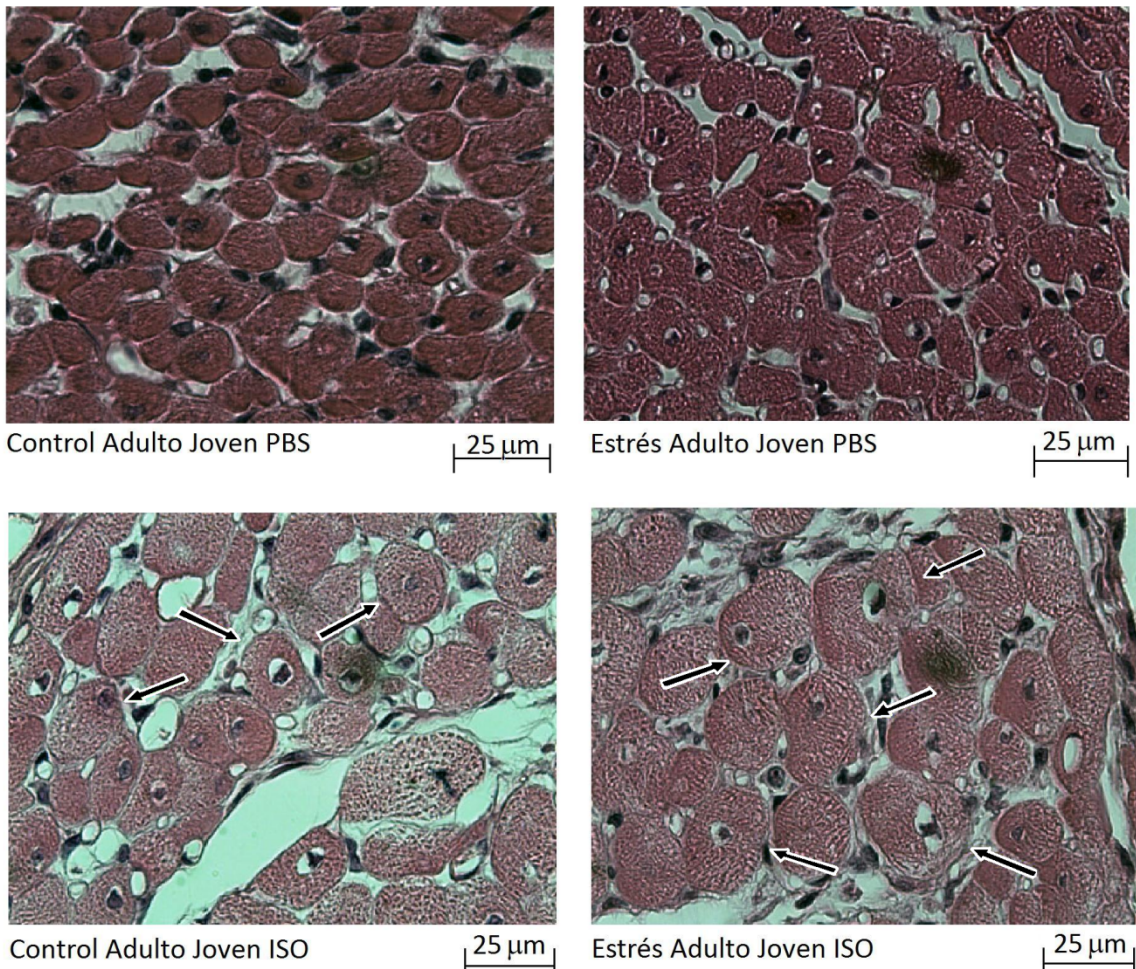


Figura 16: Microfotografías de cortes histológicos de ratas adulto joven que fueron tratadas con isoproterenol o PBS. En las fotografías se indica con flechas negras los cardiomiocitos de ratas tanto control ISO, como estrés ISO a los que se les midió área y perímetro. Para todas las mediciones se utilizó un $n=6$.

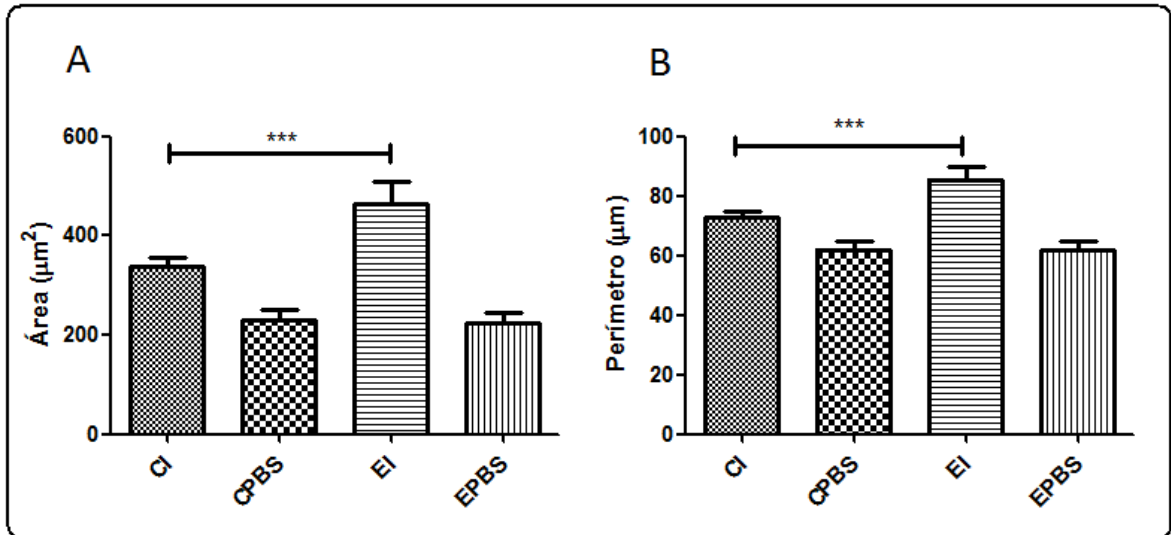


Figura 17: Cuantificación área y perímetro cardiomiocitos. Se midió el área y perímetro de cardiomiocitos en grupos de ratas adulto joven que recibieron diferentes tratamientos de ISO o PBS. A: Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6). *** $p < 0.001$ CI vs EI; ### $p < 0.001$ CPBS vs CI y EI; &&& $P < 0.001$ EPBS vs CI y EI. B: Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6). *** $p < 0.001$ CI vs EI; ### $p < 0.001$ CPBS vs CI y EI; &&& $p < 0.001$ EPBS vs CI y EI. Abreviaturas: CI: Control Adulto Joven ISO; EI: Estrés Adulto Joven ISO; CPBS: Control adulto joven PBS; EPBS: Estrés Adulto Joven PBS.

6.2.3 Cuantificación proteína β -MHC y colágeno tipo I por Inmuno Western Blot.

Finalmente se cuantificaron los niveles de proteína β -MHC y colágeno tipo I entre ratas estresadas y controles que recibieron ISO o PBS. En cuanto a la medición de β -MHC (figura 18), se observa que no existen diferencias al comparar los grupos control y estrés que recibieron ISO, o bien entre los que recibieron PBS. Sin embargo, se observa un aumento significativo de la proteína entre la descendencia de ratas estresadas que recibieron ISO vs PBS (5.158 ± 1.822 vs 0.954 ± 0.329 , $p=0,05$) y no así entre las ratas controles que recibieron ISO vs PBS. Luego al analizar la diferencia entre tratamientos ISO vs PBS en ratas de la misma condición (control o estrés) expresado como:

[Cantidad β -MHC rata tratada con ISO - Cantidad β -MHC rata tratada con PBS= Aumento β -MHC por tratamiento.],

se observa que el aumento fue mayor entre ratas estresadas (4.204 ± 1.851 aumento proteína grupo estrés vs 1.159 ± 0.812 aumento proteína grupo control).

Por otro lado, en cuanto a la cuantificación de la proteína colágeno tipo I (figura 19) se observa que tampoco existen diferencias entre las ratas del grupo estrés ISO vs Control ISO, sin embargo en ambos se observa aumento al comparar con su respectivo grupo de ratas que recibieron PBS (0.468 ± 0.079 Control ISO vs 0.073 ± 0.026 Control PBS, $p= 0,05$ y 0.446 ± 0.15 Estrés ISO vs 0.0407 ± 0.031 Estrés PBS, $p=0,05$) sin encontrarse diferencias significativas entre los aumento de la proteína al comparar las ratas del grupo Estrés vs Control (0.406 ± 0.153 aumento proteína grupo estrés vs 0.395 ± 0.084 aumento proteína grupo control).

Por otro lado se puede observar en las microfotografías de corte de corazón teñido con Tricromo Masson (Figura 20), un aumento de número de focos fibróticos en las ratas tratadas con ISO, en especial de las descendientes de madres estresadas. Asimismo, se puede observar focos fibróticos de mayor amplitud en el corte de corazón proveniente de una rata del grupo estrés PBS, evidenciando presencia de focos fibróticos tempranos, no causados por una nueva estimulación adrenérgica.

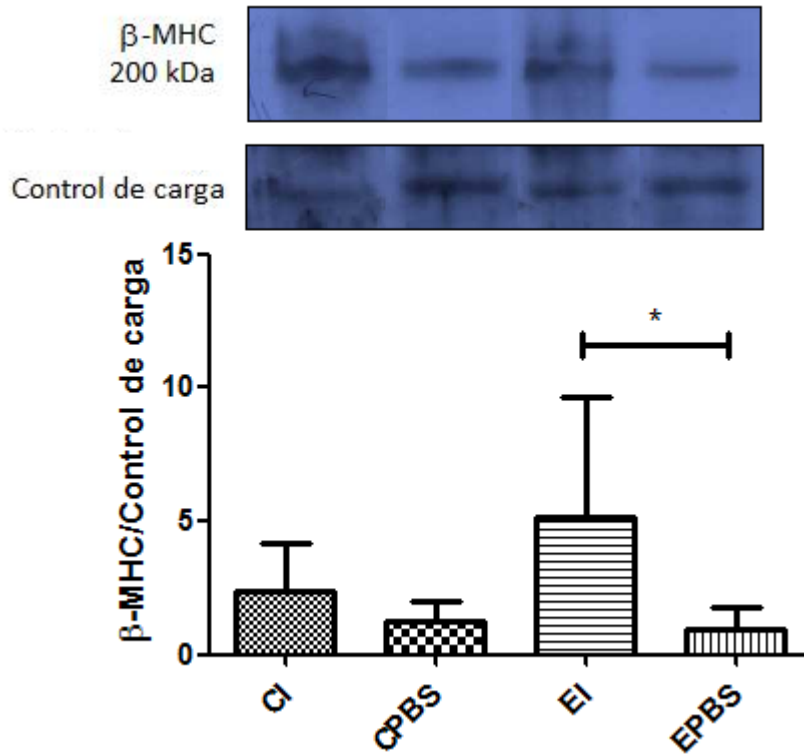


Figura 18: Cuantificación proteína β -MHC en ratas adulto joven tratadas. Se cuantificó la cantidad de proteína β -MHC entre los grupos de ratas adulto joven que recibieron PBS o ISO, por IWB. Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6).* <0.05 EI vs EPBS. Abreviaturas: CI: Control Adulto Joven ISO; EI: Estrés Adulto Joven ISO; CPBS: Control adulto joven PBS; EPBS: Estrés Adulto Joven PBS.

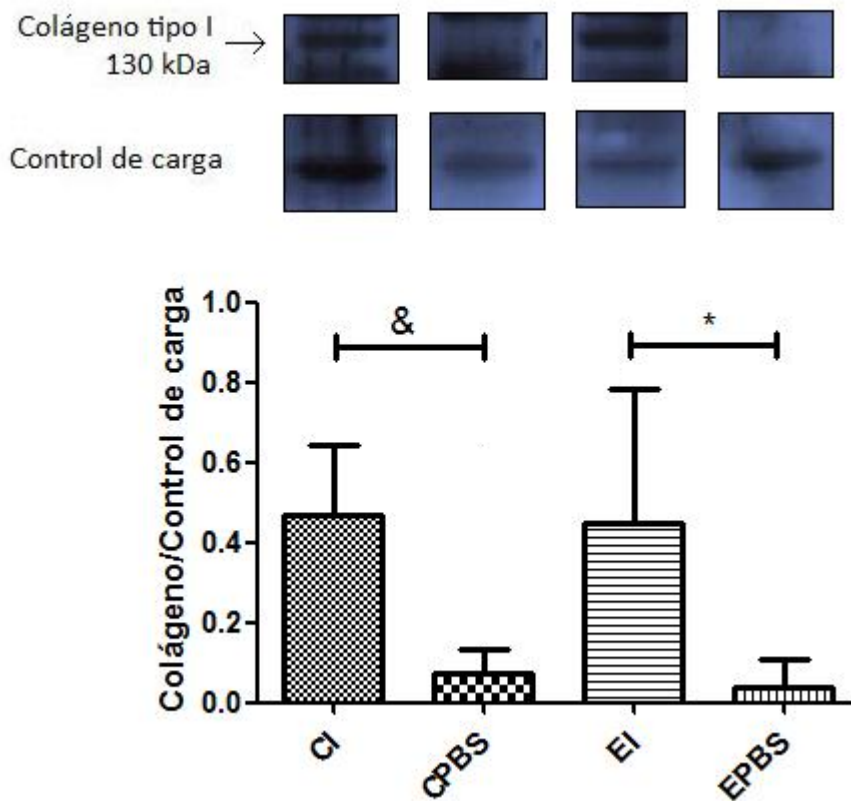


Figura 19: Cuantificación proteína Colágeno tipo I entre ratas tratadas. Se cuantifico la cantidad de proteína Colágeno tipo I entre los grupos de ratas adulto joven tratadas con PBS o ISO, tanto control como estrés por IWB. Los resultados se presentan como promedio \pm SEM (n=6). * <0.05 EI vs EPBS; & <0.05 CI vs CPBS. Abreviaturas: CI: Control Adulto Joven ISO; EI: Estrés Adulto Joven ISO; CPBS: Control adulto joven PBS; EPBS: Estrés Adulto Joven PBS.

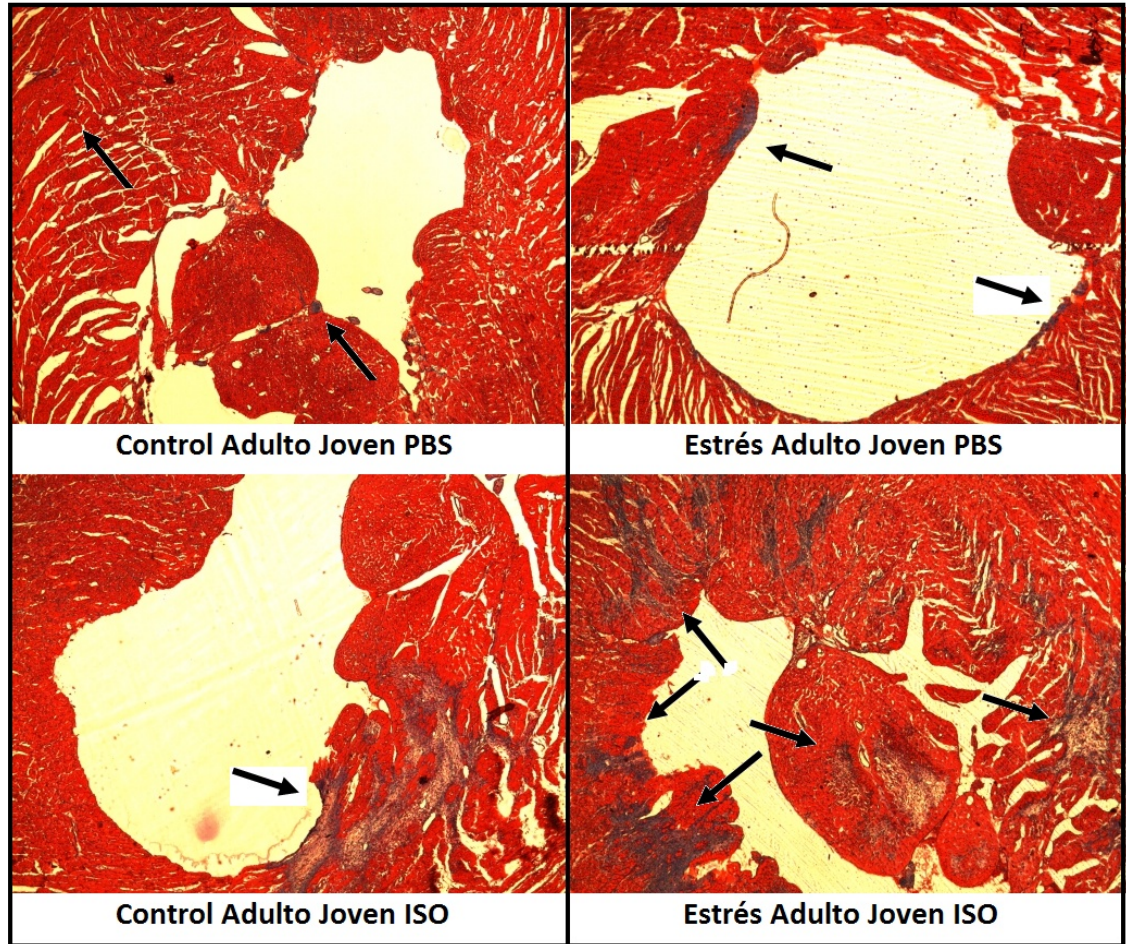


Figura 20: Microfotografías de cortes histológicos teñidos con Tricromo Masson. En las microfotografías se indica con puntas de flechas los sitios de focos fibróticos de cada uno de los cortes representativos de cada muestra. Para el análisis se considero n=6.

7. DISCUSIÓN

El presente trabajo estudió si existe “fetal programming” a nivel cardiovascular cuando la madre es estresada crónicamente por medio de estrés por frío.

Efecto “Fetal Programming” en descendencia de ratas machos.

Es necesario mencionar que en este estudio se usó la descendencia de machos, dado que según lo mencionado en estudios previos a éste, es imprescindible discriminar el efecto de “fetal programming” entre machos o hembras, no siendo extrapolable los resultados encontrados en un sexo, para determinar los efectos en ambos. En función de lo recientemente mencionado, existe además información que indica que virtualmente en todos los estados de desarrollo, los fetos e infantes de machos crecen más rápido que las hembras. De esta manera, el rápido crecimiento del feto involucra que éstos sean generalmente más vulnerables a los efectos- por Ej. de una nutrición inadecuada- y el incremento de esta tasa de crecimiento es responsable de la mayor vulnerabilidad de los machos que de las hembras antes de nacer³⁶. Junto con ello se ha sugerido que durante la preimplantación, los embriones de machos tienen mayor capacidad de responder a un medio maternal y pueden mostrar como consecuencia, una sensibilidad mayor ante influencias específicas de “Fetal programming”⁵. Sumado a esto se ha demostrado que hipoxia durante la gestación de la rata- uno de los posibles mecanismos que afectaron la gestación de las ratas en el presente modelo- resulta en alteraciones en la función vascular en el macho, pero no en la descendencia de hembras³⁷. Finalmente se ha sugerido que la testosterona juega un importante rol en el control de la presión sanguínea y puede contribuir en diferencias por sexo en hipertensión esencial en humanos y también en modelos animales de hipertensión³⁴, por ello el presente estudio se focalizó únicamente en el efecto de una gestación alterada en la descendencia de machos, dado que la literatura ha reflejado mayores efectos a nivel de la descendencia de éstos, que de hembras. Sin embargo, no descartamos efectos cardiovasculares en la descendencia de hembras, dado que los efectos de “Fetal programming” también se pueden ejercer sobre éstas, pero probablemente en una medida distinta.

Efecto de estrés por frío en el tamaño de la descendencia al nacer.

Uno de los primeros parámetros que logramos identificar y que puso en manifiesto el efecto de éste estrés, fue el tamaño y peso corporal de las ratas al ser sacrificadas a los 4 días de vida. Previamente en la literatura habíamos encontrado que los patrones de proporciones corporales al nacer podrían predecir muertes por enfermedades cardiovasculares y se podrían resumir como, pequeña circunferencia craneana, o bien descendencia pequeña o de bajo peso al nacer, lo cual reflejaría crecimiento fetal retardado, así como también bajo peso de la placenta o razones alteradas del peso de la placenta al nacer³⁸. Sin embargo, en los últimos años la asociación con bajo peso al nacer ha sido gradual, dado que el efecto de “Fetal programming” puede estar presente incluso en niños que presentaron peso normal al nacer, y no depende simplemente si nacieron prematuros y con restricción del crecimiento intrauterino³⁹, sino que de hecho se ha visto que el peso al nacer, si bien sirvió antiguamente como marcador en estudios epidemiológicos, es actualmente un descriptor inadecuado de las características fenotípicas de un bebé para determinar cómo será su salud a largo plazo⁴⁰.

En este estudio logramos encontrar que las crías descendientes de madres estresadas presentaron al nacer un mayor peso corporal que las crías de madres control, tendencia que se mantuvo hasta el crecimiento prepuberal, para luego normalizarse cuando todas las crías alcanzaron la adultez. Este fenómeno se podría atribuir a lo publicado de los estudios realizados por Pacak et al.¹⁶, en donde se menciona que existe un fuerte aumento en los niveles de NA y A durante las primeras tres horas de estrés, sin existir grandes variaciones en los niveles cortisol, cuando se expone a una rata a un protocolo de estrés por frío a 4°C. Es importante mencionar que el cortisol elevado en ratas preñadas causa restricción del crecimiento, HTA, hiperglicemia, aumento de la actividad del eje hipotálamo- pituitaria- adrenal y comportamientos de ansiedad en situaciones adversas en la adultez de la descendencia⁴¹⁻⁴². De esta manera, se sugiere descartar al cortisol como posible gatillante de enfermedades cardiovasculares, dado que las crías presentaron un peso mayor al nacer y se ha visto en estudios previos, que no existen grandes alteraciones en las concentraciones plasmáticas de cortisol durante el protocolo de estrés por frío, de manera que en este estudio afectasen el desarrollo de las crías machos.

Por otro lado, se ha visto que la exposición al frío aumenta la ingesta de comida durante el tiempo en que el animal se encuentra enfrentado a éste agente estresor y también promueve el pasaje de nutrientes a través del sistema digestivo⁴³. Sin embargo, en este estudio se mantuvo a las madres gestantes sin comida durante el periodo de estrés por frío, vale decir durante las 3 hrs. diarias en que fueron mantenidas a 4°C, manteniendo únicamente agua para su libre ingesta y por ende el exceso de nutrientes o sobrealimentación de la madre durante el tiempo en que fue estresada diariamente también es otro punto descartado en este estudio, como causante de un mayor peso de la crías al nacer. Por lo tanto, y teniendo en cuenta que NA puede actuar a diferentes niveles cuando se ve aumentado debido al estrés por frío maternal, éste se puede unir con receptores tipo α y β adrenérgicos, en sus diferentes subtipos, y por ende, puede causar una serie de efectos a nivel fetal. Uno de éstos efectos, se debe a su afinidad con receptores tipo β_3 - adrenérgicos- siendo estos conocidos por ser los más resistentes a la desensibilización-^{44,45,46} logrando que la madre catabolice sus propios reservorios grasos y por tanto promoviendo la producción de glucosa hepática⁴⁷. Por ende, este aumento crónico de la glucosa debido a la magnitud del estrés, induciría un aumento de la glicemia maternal que podría ser el principal responsable de que las crías presenten un elevado peso al nacer. Sumado a esto una redistribución del flujo sanguíneo debido al efecto del estrés maternal y la interacción de la NA y A con receptores tipo α adrenérgicos- que causarían vasoconstricción- que podría provocar disminución del flujo sanguíneo maternal a nivel de la placenta, lo que causaría un efecto de hipoxia crónica a nivel de ésta. Con relación a esto, existe evidencia que una distribución reducida de oxígeno en el espacio de intervelllosidades lleva a cambios adaptativos en la estructura de la placenta, como se vio reflejado en estudios que muestran que la anemia maternal y los embarazos a altas alturas son asociados con vascularización alterada de la placenta y dilatación de los sinusoides capilares con vellosidades intermedias y terminales^{48,49}. De esta manera, la hipoxia ha mostrado efectos significantes sobre el desarrollo de la placenta, causando hipercapilarización de las vellosidades de la vasculatura⁵⁰ como medida compensatoria. Así baja tensión de oxígeno es fisiológica para la organogénesis y es una llave reguladora en los eventos celulares de la diferenciación temprana del trofoblasto⁵¹. Por lo tanto, el oxígeno regula de manera importante el desarrollo del árbol vascular de la placenta, así como la proliferación de las vellosidades del

trofoblasto, eventos que afectan el transporte placentario, siendo una llave reguladora en los eventos de “Fetal programming”⁶. De esta forma, los factores que han mostrado alterar la vascularización de la placenta incluyen anemia, hipoxia por altura, pre-eclampsia, diabetes maternal y el fumar⁵². Sumado a esto, se ha sugerido además que variaciones fisiológicas en la transferencia de oxígeno podría también llevar a cambios adaptativos en el hematocrito fetal y con ello, aumentar la posibilidad de variaciones anormales en el tamaño de la placenta y la transferencia de oxígeno logrando tener importantes consecuencias en el desarrollo del hígado fetal y la circulación coronaria⁹.

De esta forma, un aumento en el árbol vascular de la placenta sería el principal responsable de un aumento en la entrega de nutrientes al feto, sumado al efecto del aumento de la glicemia maternal post exposición al frío. En conjunto estarían desencadenando que la descendencia presente un elevado peso corporal al nacer, el cual se normalizaría durante el desarrollo postparto dado que este medio rico en nutrientes variaría después de nacer, logrando normalizar su peso corporal al llegar a la adultez.

Cabe rescatar que en este experimento no se pesó la placenta, de manera de demostrar un aumento en la vasculatura o tamaño de ésta, debido principalmente por la dificultad que presenta obtener ésta postparto y debido a que la literatura si bien a menudo indica que el peso de la placenta es un buen indicador de “Fetal Programming”, se ha visto que existe una falla al demostrar una relación consistente, debido a que el peso de la placenta es una pobre medida de la función de la ésta, tomando en cuenta que el peso adecuado de ésta debiese ser el que se encuentra libre de membranas, coágulos de sangre, lo cual es raramente recolectado⁹.

Respuesta del corazón ante el crecimiento normal de la descendencia de madres estresadas.

Con respecto a la evaluación de hipertrofia cardíaca, desencadenada por el crecimiento normal de ratas que sufrieron “Fetal programming”, no se encontraron diferencias al comparar MCT/MC o MV/MC, en las diferentes etapas del crecimiento, lo cual se debe a que el tamaño del corazón fue concordante con el tamaño de la rata tanto al nacer, como durante su crecimiento, lo que sumado al análisis de medición de

área y perímetro y cuantificación de colágeno tipo I, pone en manifiesto que no existió hipertrofia ni fibrosis cardíaca, debido al crecimiento normal.

Sin embargo, las diferencias en los niveles de proteína β -MHC, nos han llevado a la hipótesis de alteraciones cardiovasculares tempranas, aun cuando el animal no ha sido expuesto a un nuevo agente estresor.

Como es sabido, lesiones neurogénicas relacionadas con hipertrofia del cardiomiocito y cambios en el tejido metabólico del miocardio⁵³ pueden ser causadas por la reacción del tejido cardiovascular, ante el estrés por frío. De esta manera, pensamos que además de un fuerte componente adrenérgico causado por la madre ante el estrés por frío, se podrían causar lesiones cardíacas en ésta, debido a someter al protocolo de estrés por frío. Junto con ello, estudios previos han indicado que estrés por frío induce reducción del tamaño nuclear (por tanto atrofia) de los cardiomiocitos en la rata⁵⁴, lo que llevaría además a pensar en alteraciones cardiovasculares en la madre durante el periodo gestacional, derivados del estrés por frío. Sin embargo, hemos encontrado éste tipo de alteraciones, en el corazón de la descendencia cuando ésta alcanzó la adultez, reflejado por niveles disminuidos de proteína β -MHC. En la literatura, es posible encontrar que la reducción del tamaño nuclear del cardiomiocito ha sido la hipótesis de ser un marcador de isquemia durante periodos estrés fisiológico⁵⁴. Sin embargo en este estudio, la descendencia de machos de madres estresadas, no fue expuesta a un nuevo estrés durante el análisis de la funcionalidad del corazón durante el crecimiento hasta la adultez, lo cual nos hace pensar en la presencia de alteraciones prematuras en la funcionalidad cardíaca- de manera de causar atrofia del cardiomiocito- por el simple hecho de que la descendencia creciera. De esta forma una de nuestras primeras hipótesis, es relacionar esta atrofia a aumento del calcio citosólico, el cual ha sido asociado con daño a muchos organelos y también fuertemente asociado a apoptosis⁵⁵. Pero ante la falta de evidencia de un aumento de fibrosis, hemos asociado este fenómeno al encontrado ante aumento de las catecolaminas circulantes derivados de estrés por frío, en donde se han encontrado cambios ultraestructurales en los cardiomiocitos de las ratas, caracterizado por desarreglo de miofilamentos y parcial o total ruptura en las áreas lacunares originalmente cristalizadas. Ante dicha información nos hace tomar una hipótesis relacionada con una alteración en los receptores β - adrenérgicos, de manera que ante

concentraciones de catecolaminas normales, se produzcan daños asociados a una sobrecarga adrenérgica elevada, como la encontrada por el estrés por frío en la madre.

La hipótesis recientemente planteada, la basamos en información encontrada en la literatura en donde se han encontrado diversos efectos secundarios a la exposición de estrés por frío, por Ej. Aumento en la liberación de catecolaminas, aumento relativo del calcio intracelular, hipoxia y disminución de ATP que en conjunto actuarían en la patogénesis de alteraciones estructurales inducidas en los cardiomiocitos de la madre estresada⁵⁶, lo cual en conjunto nos indica alteraciones en los receptores β -adrenérgicos y/o en las concentraciones de NA de su descendencia, de manera que presenten tales alteraciones en cuanto a la forma del cardiomiocito y niveles de β -MHC durante la adultez. Sin embargo, en este estudio no analizamos las concentraciones plasmáticas de NA ni la densidad de receptores β adrenérgicos en la descendencia de manera de asociar lo producido en la madre a nivel cardiaco debido a la aplicación de estrés, por ende no podemos asociar con firmeza esta asociación en función de los resultados encontrados en β -MHC y forma de los cardiomiocitos de la descendencia de ratas estresadas.

Debido a tales alteraciones encontradas durante el crecimiento normal de la progenie de ratas estresadas, se propuso el análisis de la respuesta hipertrófica del corazón ante una nueva sobrecarga adrenérgica, de manera de evidenciar de una manera más clara la respuesta anormal del corazón, la cual ante la evidencia de cambio de la forma del cardiomiocito y cantidad de β -MHC durante la adultez, nos alertó sobre alteraciones mayores a nivel cardiovascular.

Respuesta hipertrófica ante tratamientos con isoproterenol.

Otro de los análisis realizados en el presente estudio, fue la evaluación de la función cardíaca en la descendencia de madres estresadas, cuando es sometida a una nueva sobrecarga adrenérgica. Para ello utilizamos el modelo desarrollado por Benjamín et al³². el cual indica que la administración del β -agonista, isoproterenol, provoca hipertrofia cardíaca, necrosis de cardiomiocitos, proliferación de fibroblastos y acumulación de tejido conectivo. Cabe rescatar que inicialmente se había pensado en utilizar un protocolo de inyección consistente en una dosis única de 50 mg/ Kg peso y

sacrificar al animal el día 10 post inyección. Sin embargo se ha demostrado que si se administra una sola dosis de isoproterenol, el grado de fibrosis subendocárdica observada 10 días después, es sólo ligeramente mayor que el de las ratas control, mientras que tratamientos repetidos producen además, necrosis de cardiomiocitos y niveles considerablemente mayores de fibrosis subendocárdica³². Por ello se decidió cambiar el protocolo por éste último, teniendo además como premisa una alta probabilidad de muerte de la descendencia de ratas estresadas, debido una sola dosis exacerbada de isoproterenol, debido a la hipótesis planteada recientemente en relación al nivel de receptores β - adrenérgico, frente al cambio la forma de cardiomiocitos y cantidad de proteína β -MHC al alcanzar la adultez.

De esta manera se evaluó el efecto de dosis de 5 mg/ Kg peso/ 10 días de isoproterenol en ratas adultas que pesaron entre 300- 380 grs. Sin embargo, y a pesar de disminuir la dosis de carga, se produjo una muerte exacerbada de las ratas tanto del grupo control como estrés, encontrando además que la mayor cantidad de muerte se produjo en ratas de alto peso corporal (información no mostrada). Ante esto, evidenciamos que el aumento de la cardiotoxicidad se reflejó en una mayor medida en grupos con una alta tasa de tejido graso⁵⁷⁻⁵⁸ y que la lipólisis tras una inyección con isoproterenol es determinante en la necrosis miocárdica debido a la generación de ácidos grasos, sus productos oxidados/ metabolizados o el daño que causan en la membrana plasmática⁵⁹. Ante tales resultados encontrados tanto en nuestros grupos experimentales como en la literatura, decidimos finalmente optar por el protocolo de inyección utilizado por Pick et al.²⁷ el cual consistió en inyectar dosis subcutáneas de 1 mg/ Kg peso de isoproterenol, proponiendo además el uso de ratas adulto jóvenes de aproximadamente 200 grs, sumado a un protocolo de dieta, de manera que éstas variaran su peso corporal en \pm 20 grs. durante todo el protocolo de inyección, de manera de evitar exceso de tejido graso.

Con este nuevo protocolo logramos identificar tempranamente una mayor respuesta al tratamiento, de las ratas provenientes de madres estresadas, en donde un 50% de ellas falleció durante los primeros 4 días de tratamiento versus una supervivencia del 100% de la ratas control tratadas con ISO, lo que demostró prematuramente que el efecto de estrés por frío maternal indujo cambios fisiológicos en el corazón, de manera

que fueron más susceptibles a infartos cardiacos tras una nueva sobrecarga adrenérgica.

Para corroborar esta mayor reactividad al tratamiento con isoproterenol se analizó nuevamente parámetros morfométricos, tales como MCT/ MC, MVI/ MC y se midió área y perímetro de los 4 grupos experimentales, lo que en su conjunto puso en manifiesto nuevamente una mayor sensibilidad al tratamiento de parte de las ratas descendientes de madres estresadas, evidenciado por un peso cardiaco mayor, y por ende también de su ventrículo izquierdo. Además se pudo apreciar un aumento exacerbado del área y perímetro de cardiomiocitos al compararlos con los de ratas control tratadas con ISO. Esto último fue bastante llamativo teniendo en cuenta los estudios realizados por Benjamín et al,³² en donde descubrieron que no existían grandes variaciones en cuanto a hipertrofia cardiaca dentro de un amplio rango de dosis de isoproterenol. Sin embargo, este aumento significativo de la hipertrofia en los corazones de ratas provenientes de madres estresadas puso en manifiesto que ante una misma dosis, el efecto podía llegar a ser un 37% mayor poniendo en tela de juicio el responsable de este mayor efecto. Se ha visto que la hipertrofia desarrollada es una medida de respuesta relacionada con la dosis de isoproterenol al tratar durante dos días, pero alcanza su máximo nivel en todas las dosis de ISO cuando se ha repetido el tratamiento por 10 días (como lo desarrollado en este experimento) y que la hipertrofia relacionada en este punto puede derivar del aumento de la carga miocárdica, que es el resultado directo de la estimulación por hormonas adrenérgicas en el corazón o como una compensación por la pérdida de cardiomiocitos³². Sin embargo, al evaluar la fibrosis desarrollada tras el tratamiento de isoproterenol, se reflejó que no existieron diferencias significativas en el desarrollo de fibrosis entre el grupo control y estrés tratado con isoproterenol. Por ello y tomando en cuenta los descubrimientos que señalan que necrosis miocárdica y fibrosis parecen ser procesos relacionados que no han sido observados de forma independiente³², me es posible afirmar que el aumento exacerbado del tamaño de los cardiomiocitos se debe por una exacerbación de la estimulación adrenérgica en los corazones de ratas estresadas ante el mismo tratamiento recibido por ratas controles, lo que sería indicativo, que el mecanismo implicado ante esta gran respuesta podría ser reflejado directamente por la cantidad de receptores β adrenérgicos que el corazón de estas ratas podría presentar.

En conjunto a toda la información planteada recientemente, se ha llegado a la hipótesis que los corazones de ratas estresadas presentarían un número mayor de receptores tipo β_1 - adrenérgicos, de manera que ante una misma dosis de ISO, sean más susceptibles a los efectos de hipertrofia, que una rata control. Sin embargo ante la falta de diferencias en el tejido fibrótico desarrollado por estas ratas, al ser comparados con su correspondiente grupo control, me es posible decir que un mecanismo protector desarrollado por estos animales, expresado como una mayor resistencia a la necrosis de cardiomiocitos, y con ello un aumento mayor y compensatorio de la hipertrofia de éstos. Sin embargo, a pesar de esto, el aumento de Colágeno tipo I al comparar las ratas del grupo estrés ISO versus estrés PBS, evidenció un aumento significativo de la fibrosis, resultado no encontrado cuando se realizó el mismo experimento entre ratas control, por ende el efecto de estrés gestacional indujo mayor respuesta hipertrófica y fibrótica al ser estimulados con dosis de ISO, resultado que además se ve expresado en un mayor número de focos fibróticos, al teñir cortes de corazón con Tricromo Masson. Sin embargo, dicho resultado no fue significativo si se compara la cantidad Colágeno tipo I desarrollado por ambos grupos tratados con ISO.

Nuestra hipótesis basada en que el efecto exacerbado se debió al aumento en la cantidad de receptores tipo β_1 - adrenérgicos, viene desde la premisa que en nuestro laboratorio se ha encontrado preliminarmente que en la descendencia de ratas hembras de madres estresadas existe una mayor densidad de estos receptores a nivel cardiaco. Sin embargo esta es una información que se debiese analizar en profundidad a futuro, dado que como había mencionado inicialmente, no es posible hacer una correlación entre lo encontrado en las hembras y lo esperado en los machos, debido a las diferencias de cómo afecta “fetal programming” en los diferentes sexos, mediado principalmente por el efecto de las hormonas sexuales (mediado como efecto protector en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en la adultez, para el caso de estrógenos en el caso de hembras, contrario a lo que sucede con el exceso de testosterona en machos)³⁴ y por la forma en que cada sexo responde antes los efectos de estrés *in utero*.

En función de lo recientemente expuesto, la teoría de un aumento en la cantidad de receptores β_1 adrenérgico en el corazón de ratas macho descendiente de madres estresada, se puede correlacionar en función de lo encontrado en madres que padecen

de feocromocitoma en donde se ha evidenciado que las catecolaminas sólo cruzarían la placenta de forma mínima, debido a exacerbado clearance desarrollado por la placenta y por lo tanto, el feto parece no afectarse por los altos niveles maternos. Sin embargo, como se había mencionado anteriormente podría existir algún elemento de hipoxia debido a la vasoconstricción del lecho vascular uterino y de la placenta. De esta manera me es posible pensar en que si bien el aumento del clearance por parte de la placenta- debido a los niveles aumentados de NA y A debido al estrés por frío crónico- es un mecanismo inicialmente protector para el feto en desarrollo en cuanto a ser beneficiosa en términos de crear una alta tasa de depuración de catecolaminas, dado que la placenta se adaptó a esta alta tasa de catecolaminas desde un comienzo debido a que el estrés ha estado presente desde minutos de transcurrida la concepción. Sin embargo este clearance puede ser tan exacerbado, que sólo cantidades muy mínimas de catecolaminas llegarían al lecho vascular fetal, de manera de condicionar también a éste, respondiendo de igual forma ante estas cantidades mínimas, razón por la cual el corazón fetal y – por qué no la medula adrenal- se condicionan a funcionar con cantidades mínimas, de manera que se produciría una adaptación de los receptores adrenérgicos, mediante la reclutación de un número aumentado de éstos comparado con el número desarrollado por un feto desarrollado en condiciones normales. Por ende esta mayor reclutación de receptores no sólo se podría encontrar a nivel cardíaco, si no que a nivel de diferentes tejidos que responden ante alzas de catecolaminas, como por Ej. El lecho vascular, de manera que la descendencia de madres estresadas, no sólo serían más susceptibles a daño cardíaco mediado por un aumento en los niveles de catecolaminas circulares, por Ej. Ante un nuevo estrés, sino que también sería susceptible de desarrollar aumento de la presión arterial, lo cual también estaría influyendo en la patología cardíaca.

Nuevas perspectivas.

Luego de finalizados los experimentos, quedó nuevamente en evidencia que el rol de la placenta no es simplemente como un participante pasivo del desarrollo fetal, dado que alteraciones en la homeostasis de la madre, podrían afectar de una u otra manera en el desarrollo fetal, mediado por una actividad alterada de la placenta, derivado de cambios funcionales de ésta, dado que ha adaptado su actividad a un medio interno alterado por parte de la madre. De esta forma hemos asociado en el presente estudio

la hipótesis que se ha barajado en los últimos años, que indica que mientras la placenta se adapta al medio ambiente maternal, ocurren cambios en su estructura y función, los cuales tendrían como resultado neto, cambios en el suministro de nutrientes y hormonas al feto. En función de esto, la placenta asumiría un rol protagónico en "Fetal programming", dado que su funcionalidad alterada, se vería reflejada en enfermedades post parto en la descendencia en gestación.

De esta forma en el presente estudio evidenciamos que el efecto de "Fetal programming" debido a que la madre fue estresada crónicamente mediante estrés por frío durante todo el periodo gestacional, responde a una mayor susceptibilidad a enfermedades cardiovasculares de la descendencia, cuando ésta se ve sometida a un nuevo agente estresor, expresado principalmente como una sobrecarga adrenérgica.

Luego y en función de los resultados encontrados, es importante seguir haciendo experimentos de manera de evidenciar si existen alteraciones a nivel de receptores β adrenérgicos, o bien en la cascada río abajo cuando estos son activados. Junto con ello, es preciso analizar a futuro las posibles dianas terapéuticas de manera de crear tratamientos útiles de manera de evitar "Fetal programming" o bien, evitar que se manifiesten las modificaciones derivadas de éste que podrían llevar a anormalidades funcionales, en este caso de la función cardíaca de la descendencia, de manera de disminuir la prevalencia de enfermedades cardiovasculares.

Además podemos notar, que mientras el medio adverso *in utero* no puede ser prevenido, es posible tratar a los niños que fueron gestados en embarazos de alto riesgo, de manera de aminorar o prevenir los efectos a largo plazo de tal medio ambiente.

Junto con ello, si bien la intervención farmacológica puede ser posible a mediano y largo plazo, es difícil de imaginar como tal intervención podría ser demostrada en humanos, por ello la atención debiese ser enfocada a estrategias de prevención, llevando al desarrollo de intervenciones en la salud pública⁸, de manera de aminorar los riesgos ligados a "fetal programming" y a su vez crear políticas saludables, por medio de estrategias preventivas, tanto para la madre gestante, como para su descendencia en su vida post uterina.

Finalmente podemos concluir que el desarrollo de la placenta y su función, son determinantes en el desarrollo fetal. De esta forma información aportada por la placenta hacia el feto, indica a éste como será la vida cuando éste se desarrolle fuera del útero y de esta forma, el feto puede ajustar su desarrollo de manera de estar mejor adaptado al medio ambiente externo. Así mientras estas adaptaciones pueden asegurar la supervivencia a corto plazo, ellas pueden llevar a un aumento de las tasas de enfermedades en la vida adulta.⁶⁰

8.- CONCLUSIONES.

Del presente trabajo se concluye que:

1. Una alteración en la homeostasis de la madre, podría dañar la función placentaria y por ende el desarrollo fetal.
2. Las crías de madres estresadas presentarían un mayor tamaño al nacer debido posiblemente al mayor traspaso de glucosa y nutrientes por medio de la placenta, hipotéticamente causado por el aumento del lecho vascular de esta.
3. El peso corporal de las crías se normalizaría durante el crecimiento hasta llegar a la adultez, debido a que las crías ya no se encuentran en un ambiente rico en nutrientes y hormonas.
4. No se producirían alteraciones a nivel cardiovascular apreciables, en términos de fibrosis e hipertrofia cardíaca durante el crecimiento normal hasta la adultez.
5. Cuando la descendencia de madres estresadas es sometida a una nueva sobrecarga adrenérgica, se produce una muerte exacerbada, efecto no producido en ratas control.
6. Se observa una mayor respuesta al tratamiento de ISO, por parte de la descendencia de machos de madres estresadas, evidenciado por un aumento exacerbado el área y perímetro de cardiomiocitos y por aumentos substanciales en la cantidad de β -MHC y Colágeno tipo I, al comparar contra ratas también descendentes de madres estresadas, pero tratadas con PBS.
7. En conjunto se concluye, que existiría un componente molecular afectado a nivel cardiovascular que produce una mayor sensibilidad ante el tratamiento con ISO.
8. La descendencia de machos de madres estresadas, presenta alteraciones a nivel cardiovascular que los hace más susceptibles, a daño cardiovascular y

muerte por infartos, ante la presencia de un nuevo agente adrenérgico y /o estresor que produzca una elevada concentración de catecolaminas plasmáticas.

9.- REFERENCIAS

1. Banco Mundial. Informe sobre el desarrollo mundial. 1ra. Washington. Estados Unidos. 1993.
2. Yajnik CH. The insulin resistance epidemic in India: fetal origins, later lifestyle or both. *Nutrition Reviews*. 2001; 59: 1-9.
3. OPS. La salud en las Américas. Publicación Científica y Técnica N° 587, 2002
4. Instituto Nacional de Estadísticas (INE) Anuario de Demografía 2000. Chile 2000
5. Nathanielsz, P. Fetal programming: how the quality of fetal life alters biology for a lifetime. *NeoReviews*. 2000; 1: e126-e131.
6. Myatt, L. Placental adaptive responses and fetal programming. *Journal. Physiological Society*. 2006;572: 25:30
7. Godfrey, K. Barker, D. Fetal programming and adult health. *Public health nutrition*.2001; 4: 611-624.
8. Lewis, R. Poore, K., Godfrey, K. The role of the placenta in the developmental origins of health and disease-Implications for practice. *Reviews in gynaecological and perinatal practice*. 2006; 70- 79
9. Drake, A.J., Walker, B.R. The intergenerational effects of fetal programming: non- genomic mechanisms for the inheritance of low birth weight and cardiovascular risk. *Journal of Endocrinology*. 2004; 180: 1-16.
10. Sterling, P., Eyer, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. Fisher S, Reason J. (Ed). *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*, New York, John Wiley & Sons. 1988: 629-649.

11. Selye, H. The stresses of the life. New York: McGraw- Hill. 1956.
12. Selye, H. Stress. Montreal, Canada: Acta. 1950/ 1955.
13. Guo, A. Nappi, R. Criscuolo, M. Ficarra, G. Amram, A. Trentini, G. Petraglia, F. Genazzani, A. Effect of chronic intermittent stress on rat pregnancy and postnatal development. European journal of obstetrics and gynecology and reproductive biology. 1993; 41-45.
14. Benedict, C. Fillenz, M. Stanford, C. Noradrenaline release in rats during prolonged cold-stress and repeated swim-stress. The British Pharmacological Society. 1979: 66; 521-524.
15. Morrisco, C., Zebrowski, D.C., Vatner, D., Vatner, S., Sadoshima, J. B-adrenergic cardiac hypertrophy is mediated primarily by the β 1- subtype in the rat heart. Journal of Molecular and Cellular Cardiology. 2001; 33: 561-573.
16. Pacak, K. Palkovits, M. Yadid, G. Kvetnansky, R. Kopin, I. Goldstein, D. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. American journal of Physiology. 1998; R1247-55.
17. Symonds, M. E.; Bryant, M. J.; Shepherd, D. A.; Lomax, M. A.; The effect of shearing on the energy metabolism of the pregnant ewe. British Journal of Nutrition. 1986; 56: 635-643.
18. Gnanalingham, M. G.; Giussani, D. A.; Sivathondan, P.; Forehead, A. J.; Stephenson, T.; Symonds, M. E.; Gardner, D. S. Chronic umbilical cord compression results in accelerated maturation of lung and brown adipose tissue in the sheep fetus during late gestation. American Journal of Physiology. 2005; 289; E456-E465.
19. Budge, H. Stephenson, T. Symonds, M. Maternal nutrient restriction is not equivalent to maternal biological stress. Current Drug Targets. 2007; 8:888-893.

20. Martin G. Sharpe, N. Left ventricular remodeling after myocardial infarction. Pathophysiology and therapy. *Circulation Journal*. 2000; 101: 2981-2988.
21. Escudero, M. Pinilla, O. Paradigms and paradoxes of left ventricular hypertrophy: from the research laboratory to the clinical consultation. *Archivos de cardiología de México*. 2007; 77: 237-248.
22. Meerson, F. The myocardium in hyperfunction, hypertrophy and heart failure. *Circulation Research*. 1969; 25:1-163.
23. Barry, S. Davidson, S. Townsend, P. Molecular regulation of cardiac hypertrophy. *The international journal of biochemistry and cell biology*. 2008; 40: 2023-2039.
24. Wilkins BJ, Molkenin JD. Calcium-calcineurin signaling in the regulation of cardiac hypertrophy. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2004; 322: 1178–91.
25. Hunter, J. Chien, K. Signaling pathways of cardiac hypertrophy and failure. *The new england journal of medicine*. 2000; 1276-1283.
26. Nogueira, T. Ferreira, C. Mora, O. Doingos, J. Póvoa, R. Luna, B. De Jesus, M. Murad, N. Costa, A. Pravastatin protection from cold stress in myocardium of rats. *Japanese Heart Journal*. 2003: 243-255.
27. Pick, R., Jalil, J. E., Janicki, J. S., Weber, K. T. The fibrillar nature and structure of Isoproterenol- induced myocardial fibrosis in the rat. *American Journal of Pathology*. 1989; 134: 365-371.
28. Balazs, T., Arena, E., Barron, C.N. Protection against the cardiotoxic effect of isoproterenol HCl by restricted food intake in rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1972; 21: 237-243.
29. Nakamura, K. Et al. Inhibitory effects of antioxidants on neonatal rat cardiac myocyte hypertrophy induced by tumor necrosis factor- α and angiotensin II. *Circulation*.

1998; 98: 794-799

30. Hales, C., Barker, D., Clark, P., Cox, L., Fall, C., Osmond, C., Winter, P. Fetal and infant growth and impaired glucose tolerance at age 64. *British Medical Journal*. 1991; 303: 1019-1022.
31. Barker, D., Osmond, C., Simmonds, S., Wield, G. The relation of small head circumference and thinness at birth to death from cardiovascular disease in adult life. *British Medical Journal*. 1993; 306: 422- 426.
32. Chien, K., Zhu, H., Knowlton, K., et al. Transcriptional regulation during cardiac growth and development. *The Annual Review of Physiology*. 1993; 55: 77-95.
33. Benjamin I., Jalil, J., Tan, L., Cho, K., Weber, K., Clark, W. Isoproterenol- induced myocardial fibrosis in relation to myocyte necrosis. *Circulation Research*. 1989; 65: 657-670.
34. Barker, D.J.P. Mothers, babies and disease in later life. *British Medical Journal*. 1994.
35. Grigore, D., Ojeda, N., Alexander, B.T. Sex differences in the fetal programming of cardiovascular disease. *Gender Medicine Journal* 2008; 5: 5 (suppl A); S121-S132.
36. Kwong, WY. Wild, A.E., Roberts, P., et al. Maternal undernutrition during the preimplantation period of rat development causes blastocyst abnormalities and programming of postnatal hypertension. *Development*. 2000; 127: 4195- 4202.
37. Hemmings, D.G., Willims, S.J., Davidge, S.T. Increased myogenic tone in 7- month-old adult male but not female offspring from rat dams exposed to hypoxia during pregnancy. *American Journal Physiology Heart and Circulatory Physiology*. 2005; 289: H674-682.
38. Godfrey, K.M. The role of the placenta in Fetal Programming- A Review. *Placenta*. 2002; 23: S20-S27.

39. Forsen, T., Eriksson, J., Tuomilchto, J., Teramo, K., Osmond, C., Barket D. Mother's weight in pregnancy and coronary hearth disease in a cohort of Finnish men: follow up study. *British Medical Journal*. 1997; 315: 837-840.
40. Barker, D.J.P. Fetal programming of coronary hearth disease. *Endocrinology and metabolism*. 2002; 13: 364-368.
41. Lindsay, R.S, Lindsay, R.M., Waddell, B.J, Seckl, J.R. Prenatal glucocorticoid exposure leads to offspring hyperglycaemia in the rat: studies with the 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibitor carbenoxolone. *Diabetologia*. 1996; 39: 1299-1305.
42. Welberg, L.A., Seckl, J.R., Holmes, M.C. Inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, the foeto-placental barrier to maternal glucocorticoids, permanently programs amygdala GR m RNA expression and anxiety- like behaviour in the offspring. *European Journal of Neuroscience*. 2000; 12: 1047-1054.
43. Symonds, M.E., Bryant, M.J., Lomax, M.A. The effect of shearing on the energy metabolism of the pregnant ewe. *British Journal Nutrition*. 1986; 56: 635-643.
44. Carpene, C., Galitzky, J., Collon, P., Esclapez, F., Dauzats, M., Lafontan, M. Desensitization of β 1 and β 2, but not β 3 adrenoceptor- mediated lipolytic responses of adipocytes after long- term noreprinephrine infusion. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1993; 265: 237-247.
45. Granneman, J.G. Effect of agonist exposure on the coupling of β 1 and β 3 adrenergic receptors to adenylyl cyclase in isolated adipocytes. *Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 261:638-642.
46. Kudej, R., Iwase, M., Uechi, M. Et al. Effects of chronic β - adrenergic receptor stimulation in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 1997; 29: 2735-2746.

47. Symonds, M.E.; Bryant, M.J., Shepherd, D.A., Lomax, M.A. Metabolic adaptation during pregnancy in winter-shorn sheep. *British Journal Nutrition*. 1988; 60: 249-263.
48. Burton, G., Reshetnikova, O.S., Milovanov, A.P., Teleshova, O.V. Stereological evaluation of vascular adaptations in human placental villi to differing forms of hypoxic stress. *Placenta*. 1996; 17: 49-55.
49. Kadyrov, M., Kosanke, G., Kingdom, J., Kaufmann, P. Increased fetoplacental angiogenesis during first trimester in anaemic women. *The Lancet*. 1998; 352: 1747-1749.
50. Kingdom, J.C., Kaufmann, P. Oxygen and placental villous development: origins of fetal hypoxia. *Placenta*. 1997; 18: 613-623.
51. Genbacev, O., Zhou, Y., Ludlow, J.W., Fisher, S.J. Regulation of human placental development by oxygen tension. *Science*. 1997; 277: 1669-1672.
52. Mayhew, T.M., Charnock- Jones, D.S., Kauffmann, P. Aspects of human fetoplacental vasculogenesis and angiogenesis III. Changes in complicated pregnancies. *Placenta*. 2004; 25: 127-139.
53. Cox, B.F., Bishop, V.S. Neural and humoral mechanisms of angiotensin- dependent hypertension. *American Journal of Physiology*. 1991; 261: H1284- H1291.
54. Meneghini, A., Ferreira, C., Abreu, L.C., Ferreira, M., Ferreira F.C., Valenti, V.E., et al. Cold stress effects on cardiomyocytes nuclear size in rats: light microscopic evaluation. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular* 2008; 23: 530-533.
55. Bojarski, L., Herms, J., Kuznicki, J. Calcium dysregulation in Alzheimer's disease. *Neurochemistry International. The Journal of cellular and molecular neuroscience*. 2008; 52: 621-63.

56. Robbins, S.L., Cotran, R.S., Kumar, V., Collins, T. Cell injury and cell death. Robbins, editor: Pathologic basis of diseases. Philadelphia: Saunders. 1999; 1:1-30.
57. Balazs, T., Sahasrabudhe, M. R., Grice, H. C. The influence of excess body fat on the cardiotoxicity of isoproterenol in rats. Toxicology and Applied Pharmacology. 1962; 4: 613-620.
58. Pamarthi F. Mohan, PhDa and Sherman Bloom, MD. Food Restriction Protects and Obesity Increases Vulnerability to Isoproterenol-Induced Myocardial Necrosis in Rats. Cardiovascular Pathology. 1997; 6: 287-291.
59. Pamarthi M., Sherman B. Lipolysis Is an Important Determinant of Isoproterenol-Induced Myocardial Necrosis . Cardiovascular Pathology. 1999; 8: 255-261.
60. Gluckman, P.D, Hanson, M.A. Living with the past: evolution, development and patterns of disease. Science. 2004; 305: 1733-1736.
61. Caspari, P.G., Newcomb, M., Gibson, K., Harris, P. Collagen in the normal and hypertrophied human ventricle. Cardiovascular Research.1977; 11: 554-558.
62. Medugorac I. Collagen content in different areas of normal and hypertrophied rat myocardium. Cardiovascular Research. 1980; 14: 551-554.
63. Bishop, S.P., Melsen, L.R. Myocardial necrosis, fibrosis, and DNA synthesis in experimental cardiac hypertrophy induced by sudden pressure overload. Circulation Research.. 1976; 39: 238-245.
64. Stanton, H.C., Brenner, G., Mayfield, E.D. Studies on isoproterenol- induced cardiomegaly in rats. American Heart Journal.1969; 77: 72-80.
65. Collins, P., Billings, C.G., Barer, G.R., Daly, J.J, Jolly, A.Quantization of isoprenaline-induced changes in the ventricular myocardium. Cardiovascular Research. 1975; 9: 797-806.

66. Kizer, D.E., Howell, B.A. On relationships between synthesis of DNA and incorporation of deoxythymidine into DNA during myocardial infarctions induced in rats by isoproterenol. *Chemico-Biological Interactions*. 1971; 4: 251-264.
67. Zou, Y. Isoproterenol activates extracellular signal- regulated protein kinases in cardiomyocytes through calcineurin. *Circulation*. 2001; 104: 102-108.