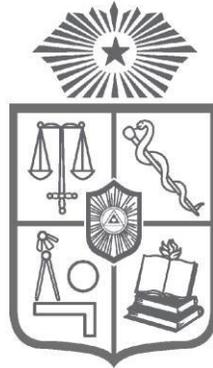


**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO**



**FUNCIÓN Y ESTRUCTURA VASCULAR DE COBAYOS
ADULTOS GESTADOS EN HIPOXIA**

CRISTIÁN ANDRÉS MARAMBIO CARREÑO

TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE
MAGISTER EN FISIOPATOLOGÍA

Una firma manuscrita en tinta azul que dice "Emilio Herrera Videla".

Director de Tesis: Prof. Dr. Emilio Herrera Videla

2024

DEDICATORIA

A Vanini, Cooper y Ellie. Por ser una infinita fuente de contención, amor, comprensión y ternura en mi vida, con su dulce y agraz.

AGRADECIMIENTOS

En este momento especial, quiero expresar mi profunda gratitud hacia el Dr. Emilio Herrera, no solo por haber sido el director de mi tesis, sino que además por haber sido un guía excepcional y un modelo de profesionalismo en la ciencia. Su dedicación, paciencia y compromiso con el crecimiento no solo mío, sino que, de sus estudiantes, han sido una fuente constante de inspiración.

Asimismo, no puedo dejar de reconocer la invaluable contribución de Felipe Beñaldo y Adolfo Paz en este viaje académico. Su arduo trabajo y entusiasmo han sido el motor que impulsa la ciencia desde el laboratorio, brindándonos a todos quienes hemos pasado por este desafío, una rica fuente de conocimiento y aproximación a la ciencia.

También quiero agradecer a todos aquellos que han sido parte de mi camino, por sobre todo a mi familia, quienes fueron fuente de alivio en los momentos difíciles y fuente de energía y alegría para afrontar desafíos y alcanzar nuevas cumbres. Les agradezco de corazón. Vuestra colaboración y apoyo han sido fundamentales para seguir adelante y alcanzar metas que parecían inalcanzables.

Este logro no solo es mío, sino de todos los que han creído en mí y han contribuido a mi desarrollo académico, profesional y profunda transformación como persona. Agradezco sinceramente a cada persona que ha formado parte de este trayecto.

ÍNDICE

Índice.....	3
Resumen.....	5
Abstract.....	6
Introducción.....	7
Hipótesis.....	19
Objetivo general.....	19
Objetivos específicos.....	19
Materiales y métodos.....	20
Animales.....	20
Miografía.....	20
Histología.....	20
Análisis estadístico.....	21
Resultados.....	22
Vasoconstricción de la arteria carótida.....	22
Vasoconstricción de la arteria carótida en machos.....	24
Vasoconstricción de la arteria carótida en hembras.....	26
Vasodilatación de la arteria carótida.....	28
Vasodilatación de la arteria carótida en machos.....	29
Vasodilatación de la arteria carótida en hembras.....	30
Vasoconstricción de la arteria femoral.....	31
Vasoconstricción de la arteria femoral en machos.....	33
Vasoconstricción de la arteria femoral en hembras.....	35
Vasodilatación de la arteria femoral.....	38
Vasodilatación de la arteria femoral en machos.....	39
Vasodilatación de la arteria femoral en hembras.....	40
Características morfológicas de la arteria carótida.....	41
Características morfológicas de la arteria carótida en machos.....	46
Características morfológicas de la arteria carótida en hembras.....	48

Características morfológicas de la arteria femoral	51
Características morfológicas de la arteria femoral en machos	56
Características morfológicas de la arteria femoral en hembras	58
Discusión	61
Conclusión	74
Proyecciones	76
Productos científicos asociados a la tesis	77
Bibliografía	83

RESUMEN

Antecedentes. La gestación en hipoxia hipobárica por altura geográfica altera la función vascular en humanos y animales no adaptados a tierras altas. Estructuralmente, puede existir una remodelación, caracterizada por cambios en cantidad y tamaño de células, que modifican el calibre vascular. Esto se acompaña de una alteración de la función vascular sistémica con disfunción endotelial. A la fecha, aún no están claros los cambios vasculares en la etapa adulta de los individuos, condicionados por la programación intrauterina, ni los mecanismos que inducen estas alteraciones, que condicionan, además, la función vascular.

Objetivo. Determinar el efecto de la gestación en hipoxia hipobárica crónica en la función y estructura de las arterias carótida y femoral de cobayos adultos.

Materiales y Métodos. Se utilizaron 21 cobayas preñadas, que, a los 30 días de gestación, se dividieron en 2 grupos experimentales: gestación en normoxia (Nx, n=12, 586 m) y en hipoxia hipobárica crónica (Hx, n=9, 3.800 m en cámara hipobárica). Al nacer (~70 días de gestación), las crías se desarrollaron en normoxia. A los 2,5 meses de edad, los animales se eutanasiaron y sus arterias fueron montadas en un miógrafo de alambre para determinar su función vascular y un segmento de las arterias fue conservado para el análisis histológico morfoestructural.

Resultados. La hipoxia hipobárica crónica disminuyó la capacidad contráctil de ambas arterias, sin cambiar la sensibilidad. Respecto a la respuesta contráctil, sólo disminuyó en machos a serotonina al separar por sexo. No se modificaron los mecanismos dependientes e independientes de endotelio para la vasodilatación. Las arterias carótidas mostraron remodelación a costa del aumento del grosor de las capas media y adventicia, con una disminución de la densidad celular endotelial y del *vasa vasorum* en la adventicia. Por otra parte, la arteria femoral mostró aumento de la densidad endotelial y del *vasa vasorum* en la adventicia.

Conclusión. La hipoxia hipobárica crónica durante la gestación determina cambios funcionales y estructurales en arterias. La comprensión de estos cambios es fundamental para el desarrollo de estrategias orientadas al control de enfermedades cardiovasculares, en los más de 80 millones de personas que habitan sobre los 2500 msnm a nivel mundial que son susceptibles al desarrollo de estas.

ABSTRACT

Background. Gestation in hypobaric hypoxia due to geographic altitude alters vascular function in humans and animals not adapted to high altitude. Structurally, there may be remodeling, characterized by changes in cell number and size, which modifies vascular caliber. This is accompanied by an alteration of systemic vascular function with endothelial dysfunction. To date, the vascular changes in the adult stage of individuals, conditioned by intrauterine programming, and the mechanisms that induce these alterations, which also condition vascular function, are still not clear.

Aim. To determine the effect of gestation in chronic hypobaric hypoxia on the function and structure of the carotid and femoral arteries of adult guinea pigs.

Materials and Methods. Twenty-one pregnant guinea pigs were used, which, at 30 days of gestation, were divided into 2 experimental groups: gestation in normoxia (Nx, n=12, 586 m) and in chronic hypobaric hypoxia (Hx, n=9, 3,800 m in hypobaric chamber). At birth (~70 days gestation), the offspring developed in normoxia. At 2.5 months of age, the animals were euthanized, and their arteries were mounted on a wire myograph to determine their vascular function and a segment of the arteries was preserved for morphostructural histological analysis.

Results. Chronic hypobaric hypoxia decreased the contractile capacity of both arteries, without changing sensitivity. Regarding the contractile response, it only decreased in males to serotonin when separated by sex. Endothelium-dependent and endothelium-independent mechanisms for vasodilation were not modified. Carotid arteries showed remodeling at the expense of increased thickness of the medial and adventitial layers, with decreased endothelial cell density and *vasa vasorum* in the adventitia. On the other hand, the femoral artery showed increased endothelial density and *vasa vasorum* in the adventitia.

Conclusion. Chronic hypobaric hypoxia during gestation determines functional and structural changes in arteries. The understanding of these changes is fundamental for the development of strategies oriented to the control of cardiovascular diseases in the more than 80 million people who live above 2500 meters above sea level worldwide who are susceptible to the development of these diseases.

INTRODUCCION

Actualmente, 81,6 millones de personas viven sobre los 2500 metros sobre el nivel del mar, concentrándose principalmente en Asia (Himalayas) y América (Cordón Andino) (Tremblay, 2021). Si bien esto corresponde a menos del 1% de la población mundial, el embarazo a gran altura proporciona una de las formas más comunes de hipoxia fetal sostenida (Herrera y cols., 2010; González-Candia & Herrera, 2021). Diversos estudios de las poblaciones de las tierras altas han mostrado una reducción de la natalidad, disminución del peso al nacer y condiciones cardiovasculares adversas en los bebés nacidos a gran altura al compararlos con los nacidos al nivel del mar (Huicho & Niermeyer, 2006). La exposición intrauterina a la hipoxia induce restricción del crecimiento fetal y se ha asociado con alteraciones cardiovasculares en la edad adulta, como hipertensión arterial sistémica (Ducsay y cols., 2018; González-Candia & Herrera, 2021). La hipoxia gestacional resulta en estrés oxidativo, reducción de la perfusión uteroplacentaria y afecta el desarrollo cardiovascular fetal (Herrera y cols., 2015). Adicionalmente existe un impacto a lo largo de la vida del individuo en su salud cardiovascular (Herrera y cols., 2016; Keyes y cols., 2003; González-Candia & Herrera, 2021). A fines de la década del 80, el epidemiólogo inglés David Barker estableció una relación de causalidad entre el retraso del crecimiento intrauterino, el bajo peso al nacer y el parto prematuro, que corresponderían a afecciones intrauterinas adversas, y los orígenes de la hipertensión, la enfermedad coronaria y la diabetes no dependiente de la insulina, en la edad media de un ser humano (Giusanni, 2021). Aun así, pese a que existe esta relación entre estas condiciones y el desarrollo de la hipertensión, aún no se han dilucidado las modificaciones desde el punto de vista funcional y estructural manifestadas en la vida adulta como herencia de una programación fetal en arterias sistémicas. Durante la gestación, la hipoxia aguda induce una respuesta conocida como *Brain Sparing* o redistribución cerebral, que favorece la preservación de órganos vitales a través de la hemo centralización (Miller y cols., 2016; Giusanni, 2021). Los factores de riesgo modificables como el índice de masa corporal elevado, la presión arterial, los niveles de lipoproteínas de baja densidad, el tabaquismo y la diabetes son reconocidos como factores importantes predisponentes y concomitantes respecto a las ECVs, sin embargo, la contribución individual de los factores depende de las

poblaciones estudiadas (Magnussen y cols., 2023). A pesar de que estos se reconocen como factores adquiridos o desarrollados durante la vida de un individuo, la evidencia ha mostrado que las ECVs pueden originarse en etapas tempranas de la vida, no solo referidas a la infancia o niñez, sino que también a la etapa prenatal en procesos de adaptación agudos como el “Brain Sparing” que pueden volverse crónicos y a la vez evolucionar de forma anómala a lo largo de la vida del humano (Blackmore & Ozanne, 2015). Estos hechos son abordados por la teoría de los orígenes en el desarrollo de la salud y la enfermedad (DOHaD, por sus siglas en inglés *Developmental Origins of Health and Disease*), la cual postula que la exposición a diversas agresiones ambientales que repercuten en la gestación, durante periodos críticos del desarrollo fetal conduce a cambios estructurales y a una adaptación funcional, lo que se traduce en un mayor riesgo de padecer enfermedades en la edad adulta, incluidas las ECVs (Hanson & Gluckman, 2011). Se ha establecido que la interacción gen-ambiente antes del nacimiento puede ser tanto o más importante para determinar el riesgo futuro de cardiopatías a través de un proceso conocido como programación del desarrollo (Gluckman y cols., 2008). En los últimos años, se ha abordado la problemática estudiando el efecto de las complicaciones en el embarazo secundarios a cambios en la nutrición materna, la exposición a hormonas del estrés, la contaminación ambiental o el abuso de sustancias por parte de la madre sobre la enfermedad cardiovascular programada en la descendencia en la edad adulta (Fowden y cols., 2006; Vassoler & Wimmer, 2021). La respuesta aguda de la hipoxia como complicación del embarazo también ha sido ampliamente estudiada dentro de este paradigma (Giussani, 2021), pero sus efectos a largo plazo aún no se conocen por completo (Gonzalez-Candia y Herrera, 2021). Sin embargo, las investigaciones recientes han dado luces de cambios epigenéticos asociadas con la aparición de disfunciones postnatales de distintos órganos (Ducsay y cols., 2018; Gonzalez-Candia y Herrera, 2021). La epigenética consiste en la herencia de variación en la expresión génica sin cambios en la secuencia de nucleótidos del ADN. La expresión es regulada por modificaciones químicas del ADN, en la cual participan además las histonas, las cuales además están reguladas por vías metabólicas, transportadores y la dieta (Goyal y cols., 2019). La hipoxia durante el periodo de incubación medio o tardío en pollos

aumentó las respuestas a la estimulación nerviosa simpática periarterial y disminuyó la función dilatadora dependiente del óxido nítrico en los vasos de las aves adultas (Ruijtenbeek y cols., 2003). Cuando se estudió el fenómeno ratas, la hipoxia prenatal, pero no la restricción de nutrientes deterioró la relajación dependiente del endotelio en la circulación entérica de las crías adultas (Fowden y cols., 2006). En ambos casos se consideró que existiría una posible predisposición genética originada en el desarrollo fetal, que, sumados con la interacción con el ambiente, pudieron dar como resultado una disfunción vascular.

La interacción con el ambiente puede provocar la programación en muchas fases del desarrollo. Por ejemplo, durante la organogénesis, durante la fase de crecimiento fetal rápido, las interacciones adversas que alteran el suministro, la absorción y la utilización de nutrientes influyen en el crecimiento tisular y pueden cambiar el ciclo celular de la proliferación a la diferenciación o viceversa, con consecuencias adversas para el número total de células (Harding & Johnston, 1995). Dado que los distintos órganos fetales crecen a ritmos diferentes, el momento de la interacción adversa o agresión ambiental es importante para determinar la especificidad tisular de los efectos programados. Adicionalmente, es preciso elegir un modelo adecuado de estudio dado el diferencial grado de madurez que presentan las especies al nacer (Fowden y cols., 1998). Así, por ejemplo, las especies altriciales que son inmaduras al nacer (roedores y conejos), varios de los sistemas fisiológicos, que se sabe que están programados en el útero continúan desarrollándose después del nacimiento. Por lo tanto, en estas especies el periodo de plasticidad evolutiva se prolonga tras el nacimiento, a diferencia de las especies precociales (humanos, ovejas, cerdos, cobayos), que son más maduras fisiológicamente al nacer (Fowden y cols., 2006). Tal cual como se mencionaba anteriormente, la clave de la programación en las diferentes etapas del individuo estaría dada en las modificaciones epigenéticas del ADN y las histonas (Ryznar y cols., 2021). Cada célula del cuerpo humano y del embrión en desarrollo tiene un epigenoma único (ADN con sus histonas), que es, en otras palabras, que genes se expresarán y a qué niveles. La importancia adicional de la programación es que estas modificaciones epigenéticas que componen el epigenoma, pueden ser relativamente estables y transmitirse de una generación celular a la siguiente (Dolinoy,

2008). La programación fetal encuentra sus bases en la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas, la impronta genómica, la remodelación de la cromatina y el ARN no codificante (Dolinoy, 2008). La metilación de bases de citosina en el ADN y las modificaciones de las histonas provocan cambios específicos en la estructura de la cromatina, regulando así los patrones de expresión génica Waterland & Garza, 1999). Profundizando en estos mecanismos, se sabe que la metilación del ADN es catalizada por la ADN metiltransferasa. La metilación de bases nucleotídicas en elementos de acción cis, como promotores o potenciadores, provoca cambios conformacionales en el ADN que impiden la unión de factores que inician la expresión génica, por lo tanto, esta metilación actuaría como inhibidor de la expresión (Vickaryous & Whitelaw, 2005). En cuanto a las histonas, las modificaciones pueden alterar la diferencia de carga entre la cola de la histona y la doble hélice del ADN, alterando así la compactación de la cromatina, pudiendo exponer o restringir el acceso a los factores de transcripción. Algunos ejemplos de modificaciones de las histonas son la metilación, la acetilación, la fosforilación y otras. Diferentes tipos de enzimas catalizan cada tipo de modificación de las histonas (Li & O'Neill, 2012). En cuanto a la impronta genómica, esta adquiere su relevancia por el factor de heredabilidad de la programación epigenética. Puede ocurrir por ejemplo un silenciamiento específico del progenitor de origen de alelos génicos específicos de la línea germinal (espermatozoide u óvulo), que se mantiene durante toda la vida de las células y este puede ser heredado a las generaciones futuras. Por último, en relación con los RNA cortos, como los miRNA y los siRNA, y los fragmentos de tRNA, descubiertos recientemente, se sabe que participan en procesos epigenéticos y su importancia radicaría en que modularían la expresión a nivel postranscripcional (Li & O'Neill, 2012). Estos procesos se saben que existen en dos periodos principales: la gametogénesis y la embriogénesis temprana (Vickaryous & Whitelaw, 2005), pero también se ha visto que ocurre en etapas más tardías del desarrollo fetal en varias especies en respuesta a la interacción en el ambiente (Constância y cols., 2004; Waterland & Garza, 1999). Los cambios inducidos por los desafíos ambientales y la interacción con el epigenoma pueden conducir a una síntesis proteica alterada y a cambios permanentes en la disponibilidad de proteínas celulares. Estas proteínas incluyen receptores, canales

iónicos, transportadores, enzimas, factores de crecimiento, proteínas citoarquitectónicas, proteínas de unión y componentes de varias vías de señalización intracelular, determinando una estrecha relación con la función y el fenotipo del individuo en cualquier etapa del individuo (Ryznar y cols., 2021). Por ejemplo, la privación de nutrientes y oxígeno producen cambios en las vías de señalización de la adenilil ciclasa y la insulina en células como los adipocitos, los hepatocitos y los miocitos, que persisten después del nacimiento e influyen en la actividad metabólica adulta (McMillen & Robinson, 2005; Ozanne & Hales, 2002). Otros ejemplos asociados con la hipoxia tisular en la etapa fetal son los cambios permanentes en la abundancia de receptores de membrana y nucleares para varias hormonas, incluyendo glucocorticoides, catecolaminas, insulina, IGF, GH, leptina y prolactina (McMillen & Robinson, 2005). Los cambios en la estructura y función celular, secundario a los cambios en la expresión y disponibilidad de proteínas con sus diferentes funciones incluyendo las vías de señalización, alteraría la morfología y fisiología de los tejidos y órganos en su conjunto. (Ryznar y cols., 2021). En varios sistemas fisiológicos, al estudiarse se deben considerar las diferencias ligadas al sexo respecto a la programación intrauterina, pues las disfunciones pueden no aparecer hasta la pubertad, pues el inicio de la esteroidogénesis gonadal puede develar anomalías fisiológicas en los tejidos periféricos o en el propio eje hipotálamo-hipofisario-gonadal (Rhind y cols., 2001). Para todos los casos, en la mayoría de los sistemas, las consecuencias adversas del compromiso intrauterino se hacen más evidentes a medida que aumenta la edad, a medida que fallan las adaptaciones compensatorias en otros tejidos y sistemas orgánicos, además de los mecanismos de compensación y reparación (McMillen & Robinson, 2005).

Al estudiar la hipoxia como estímulo ambiental adverso para el desarrollo fetal con potencial programador para la vida adulta, se deben definir conceptos clave para visualizar mecanismos implicados en los cambios que pudiesen aparecer. Para este trabajo, se partirá estableciendo que la hipoxia hipobárica (HH) a la que serán sometidos los sujetos de estudio, se refiere a la hipoxia a gran altura, es decir, a aquella que se produce secundaria a una disminución de la presión atmosférica o barométrica, mayor a los 2.500 m de altitud (Herrera y cols., 2015). La presión parcial de oxígeno

en el aire atmosférico (PO_2), que forma parte de la presión total de la atmósfera disminuye a medida que aumenta la altitud, conservando la proporción de un 21% respecto a la totalidad del aire. En otras palabras, el aumento de la altitud se asocia con una menor presión atmosférica, una menor PO_2 ambiental y, en consecuencia, una menor presión de oxígeno inspirado, con la consecuente disminución de aporte de oxígeno a los tejidos (Coppel y cols., 2015). Desde el punto de vista de los modelos de exposición disponibles, al momento de abordar los impactos en el organismo, es posible encontrar tres tipos: a) hipoxia aguda, que es aquella que ocurre cuando se induce una exposición breve (de unos pocos minutos a unas pocas horas); b) hipoxia crónica, que es aquella exposición prolongada a niveles bajos de oxígeno, llegando a días o meses. c) hipoxia cíclica o intermitente que surge debido a estrategias de intervención que involucran periodos de hipoxia alternados con periodos de normoxia (Liu y cols., 2022; Herrera y cols., 2015)). Si bien el principal factor causante de reacciones adaptativas y desadaptativas es la hipoxia, la presión atmosférica también es relevante, ya que se han demostrado diferencias entre las reacciones a la hipoxia normobárica e hipobárica y esto se asocia con la presión total que ejercen las moléculas de gas sobre la pared alveolar y, por consiguiente, sobre el intersticio, constituyendo también un estímulo potencialmente adaptativo (Götschke y cols., 2018). Aunque se ha establecido que los estados iniciales de hipoxia hipobárica intermitente (IHH) podrían ser beneficiosos al inducir una mejor función y protección cardiovascular (Herrera y cols., 2015; Aguilar y cols., 2018), cuando la hipoxia se prolonga en el tiempo, la activación de la respuesta celular crónica induce una respuesta de aclimatación, que puede inducir cambios desadaptativos, con un mayor riesgo cardiovascular (Herrera y cols., 2015; Gonzalez-Candia y cols., 2023), poniendo en evidencia la programación y aumento de la sensibilización de células, órganos o sistemas proveniente del desarrollo fetal (Ryznar y cols., 2021). La cronicidad de la hipoxia hipobárica, de manera continua o intermitente, pueden inducir a largo plazo alteraciones en la función vascular pulmonar, una presión sistólica ventricular derecha elevada e hipertensión pulmonar, además de estrés oxidativo (Thomas & Wanstall, 2003, Herrera y cols., 2015). El abordaje de la hipoxia desde el punto de vista crónico o intermitente ha sido discutido al menos durante tres décadas para los modelos de

investigación además desde el punto de vista terapéutico, en función de la posibilidad de generar cierto grado de protección en individuos con elevado riesgo cardiovascular frente a un evento isquémico miocárdico. Aun así, existe un consenso tácito en que abordajes que sean aplicados por más de 30 días inducirían el mismo efecto modelador-programador independiente de si el estímulo hipóxico hipobárico fue continuo o intermitente (Zhuang & Zhou, 1999). La respuesta a la hipoxia hipobárica crónica o intermitente, especialmente en individuos de tierras bajas, inducen indistintamente en algunos individuos efectos adversos, como policitemia, hipertrofia del ventrículo derecho e insuficiencia cardíaca (Pei y cols., 1989).

Se ha planteado que para estudiar el desarrollo podría ser adecuado utilizar especies animales pequeñas, con un ciclo de vida relativamente corto en comparación con los humanos para sortear las limitaciones éticas relacionadas con la temporalidad (desarrollo-crecimiento y posibilidad de intervención en el humano) (Morrison y cols., 2018). Aunque las especies animales grandes como las ovejas también se utilizan ampliamente en los estudios del origen de las enfermedades en el desarrollo, estas toman más tiempo para alcanzar la madurez y tienen requerimientos logísticos y presupuestarios adicionales al comparar con animales más pequeños como los roedores. Para este estudio, se consideró la utilización del cobayo (*Cavia porcellus*) para estudiar los efectos de la hipoxia hipobárica crónica durante la segunda mitad de la gestación. Este modelo tiene las siguientes características: 1. El ambiente uterino es comparable a los de los humanos (unidad feto-placentaria); 2. El proceso de desarrollo fetal es similar al de los humanos, lo cual permite comparar etapas (9 meses o 270 días del humano reducidos a los 69 a 71 días del cobayo); 3. El número fetal no es excesivo: 1 a 5 crías (generalmente 2-3), versus los 8 a 12 que pueden obtenerse en ratas o ratones; 4. Comparten patrones similares de resultados adversos a los observados en estudios en humanos después de la misma exposición, para que cualquier intervención terapéutica pueda ser completamente evaluada y equiparada al ser humano (Shaw y cols., 2016; Morrison y cols., 2018). Es importante destacar que el momento del desarrollo de los principales sistemas de órganos que se ven afectados por exposiciones intrauterina o las complicaciones perinatales con resultados adversos para la salud en humanos son similares en el cobayo (Briscoe y cols., 2004; Morrison

y cols., 2018). Desde el punto de vista de la función vascular, los cobayos nacen con nervios adrenérgicos funcionales y bien diferenciados en los tejidos periféricos incluyendo los vasos (O'Donnell & Saar, 1975), comparables a los de los humanos (Armati-Gulson & Burnstock, 1983), lo cual es relevante, dado que existen datos que sugieren que los hijos prematuros, particularmente las mujeres, tienen una regulación autonómica alterada del sistema cardiovascular (Berry y cols., 2013; Kim y cols., 2015) Respecto a lo que se sabe de la función vascular en cobayos y la morfología, la evidencia indica que se produce un aumento de la presión arterial en la vida adulta, cuando durante el desarrollo fetal se ha visto bajo reducción del flujo sanguíneo uterino, inducido experimentalmente, con la consecuente hipoxia (Battista y cols., 2002). Estos cambios se vieron asociados con disfunción endotelial periférica y remodelación vascular en la aorta a principios del periodo neonatal, empeorando a lo largo de la vida al igual que lo observado en estudios en humanos, aun cuando se han procurado el control máximo de factores de riesgo que podrían relacionarse con una evolución desfavorable de la función cardiovascular (Yzydorczyk y cols., 2017). Adicionalmente, se ha observado en cobayos adultos con bajo peso al nacer sometidos a restricción del crecimiento intrauterino, una mayor rigidez en las arterias de conducción, con una disminución adicional de la lámina elástica y de la capa media (Thompson y cols., 2011) impactando la función expresada como un aumento de la fuerza contráctil y una disminución de la relajación mediada por óxido nítrico (NO), que empeora aún más si el individuo se expone a una dieta obesogénica (Thompson y cols., 2011; Cañas y cols., 2017). Estos cambios también se observaron en las arterias de resistencia femorales (Cañas y cols., 2017).

El modelo de cobayo a utilizar requiere de un marco de referencia para aplicar el estímulo hipóxico hipobárico en estudio. Tiene un período de gestación de 67 a 70 días, pudiendo constatarse la gestación a partir del día 20 a 25 por ecografía abdominal (Herrera y cols., 2016). Se destetan de la madre a partir del día 14 al 28 o cuando han alcanzado los 180 gramos de peso (Shomer y cols., 2015) y la pubertad se produce entre los 55 y los 70 días de edad (Andrade y cols., 2002; Lapchik y cols., 2017; Kaliste, 2007; Hubrecht, 2010). El desarrollo del sistema cardiovascular comienza el día 8 y se extiende hasta el día 29, tiempo tras lo cual, hacia el nacimiento, se produce el término

del crecimiento y la migración de los órganos hasta la posición final. La implantación del embrión en la cobaya se da en el día 8, el día 10 de implantación empieza la formación del corazón y se completa a los 14 días de gestación (Loeber y cols., 1983). Entre los días 20 a 25 de gestación, se observa la presencia del embrión, los latidos del corazón fetal nos indican la vitalidad del embrión (Herrera y cols., 2016). Tanto el cerebro, como el sistema renal y el pulmonar tienen maduración prenatal, por lo tanto, el desarrollo es en conjunto con el sistema cardiovascular (Morrison y cols., 2018).

Respecto al órgano objetivo de este estudio, se abordarán dos arterias sistémicas: la carótida y femoral. Es importante destacar que existe una clasificación en base a las características histológicas, a la cual pueden aportar los resultados de este trabajo. Estas son las arterias elásticas y las arterias musculares. Las arterias musculares incluyen las arterias braquial, radial y femoral, caracterizadas por mayor cantidad de células musculares lisas en la túnica media. Las arterias elásticas son las más cercanas al corazón, como la aorta, las arterias pulmonares y carótida común, caracterizadas por mayor tejido elástico en la media. Esta característica de las arterias elásticas les permite mantener un gradiente de presión relativamente constante a pesar de la acción de bombeo constante del corazón (Tucker y cols., 2023). Su funcionamiento diferencial se pone en evidencia tempranamente frente a un evento de hipoxia aguda durante el periodo fetal. En este caso, se produce una redistribución del gasto cardíaco fetal, desviando el flujo sanguíneo de la circulación periférica hacia el cerebro, el corazón y las glándulas suprarrenales del feto. Esta defensa se ha denominado "respuesta de preservación del cerebro fetal" o "Brain Sparing", y en modelos animales, como en las ovejas fetales en gestación tardía, se refleja en un aumento del flujo sanguíneo carotídeo y un descenso del flujo sanguíneo femoral (Giusanni, 2021). La medición simultánea de la PaO₂ y flujo sanguíneo fetal en las arterias carótida y femoral de ovinos crónicamente hipóxicos dentro de cámaras hipóxicas demostró que ambas variables aumentaban significativa y progresivamente en el feto crónicamente hipóxico. Esto confirma una respuesta hemodinámica preservadora y adaptativa en el feto crónicamente hipóxico (Allison y cols., 2016). Los cambios de flujo, presión y control de estímulos que llevarían a cambios de la resistencia vascular, serían los que estarían relacionados con el fenómeno de

remodelamiento, disfunción endotelial y, por tanto, disfunción vascular (Yzidorczyk y cols., 2017). Estos cambios estarían mediados por el aumento de factores de señalización como la generación de productos de peróxido lipídico (malondialdehído) (Evans y cols., 2012), citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-6, IL-1b) y metaloproteinasas de matriz (MMP2 y 9) (Oh y cols., 2008), a lo cual se suma una disminución de la producción y de la actividad de enzimas antioxidantes, generando una modificación del óxido nítrico circulante y un estrés oxidativo (Itani y cols., 2018). Además, estos estímulos condicionan un medio proinflamatorio y sometido a estrés oxidativo que puede llevar a cambios diferenciales en cada una de las capas de un vaso sanguíneo (Gao, 2016). Por ejemplo, la íntima contiene múltiples agentes celulares, como células musculares lisas, macrófagos y linfocitos T, entre otras células implicadas en las respuestas inmunitarias innata y adaptativa. La túnica íntima también puede contener una rica microvasculatura que proporciona un portal para la entrada y potencial salida de leucocitos implicados en las respuestas inmunitarias e inflamatorias. La túnica media contiene principalmente células musculares lisas y matriz extracelular. La indoleamina dioxigenasa (IDO) producida por las células musculares lisas contribuye a la inmunoprivilegiación de la íntima. A menudo ignorada, la adventicia alberga un foco de actividad inmunitaria e inflamatoria, proporciona los *vasa vasorum* que dan lugar a la microvasculatura de la placa (Libby & Hansson, 2015). En la adventicia también se localizan estructuras linfoides terciarias organizadas. Las terminaciones nerviosas de la adventicia y los fibroblastos pueden secretar mediadores que modulan la función vascular (Gao, 2016). El estado inflamatorio que se desarrolla a nivel fetal puede, por tanto, contribuir en la remodelación y la sensibilización proveniente de la programación en la vida adulta, aportando no solo a la remodelación, sino que a la función vascular por la modificación de la expresión de genes involucrados en la señalización que participa en la capacidad y respuesta contráctil y en la regulación del tono vascular (Oh y cols., 2008).

La hipoxia hipobárica como injuria durante el desarrollo fetal afecta negativamente en la función vascular, a través de la disfunción endotelial y remodelamiento, con consecuencias que persisten en la vida adulta, pero que aún no han sido precisadas (Yzidorczyk y cols., 2017). A nivel molecular, la hipoxia prenatal desencadena

alteraciones en la regulación del Ca^{+2} intracelular (Herrera y cols., 2007, 2010; Goyal y cols., 2011). Además, hay un desacoplamiento de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), generando estrés oxidativo (Jaitovich y cols., 2017; Dikalova y cols., 2016). El aumento de radicales libres durante la hipoxia crónica perpetúa la disfunción vascular mediante la disminución de la producción de NO y el aumento de la generación de anión superóxido, siendo el estrés oxidativo un estímulo importante para el cambio de la función y la remodelación (Cheng y cols., 2022), promoviendo además la angiogénesis y crecimiento de tejido que no acaba por diferenciarse, siendo potencialmente no funcional (Hubbell y cols., 2012; Rook y cols., 2014). Esta disfunción vascular se asocia a activación nerviosa simpática, predisponiendo a un estado pro-vasoconstrictor, que en su máxima expresión se consolida como hipertensión arterial sistémica, y empeora cuando predispone la aterosclerosis por disfunción endotelial llegando a consolidar la enfermedad coronaria en la vida adulta (Simpson y cols., 2019; Baratchi y cols., 2017).

Hasta el momento, la comprensión de los mecanismos de los efectos a largo plazo en la función vascular periférica por la hipoxia crónica prenatal sigue siendo limitada (González-Candia y cols., 2020; González-Candia & Herrera, 2021).

Este trabajo busca, por lo tanto, abordar esta brecha en el conocimiento utilizando el modelo de cobayo gestado en hipoxia hipobárica crónica en la segunda mitad de la gestación para explorar las bases fisiopatológicas de la programación fetal en la función vascular de arterias carótidas y femorales en la edad adulta.

HIPÓTESIS

La gestación en hipoxia hipobárica crónica, aumenta la función vasoconstrictora, disminuye la función vasodilatadora, y altera la estructura de arterias sistémicas de cobayos adultos.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la función vascular y la estructura de las arterias carótida y femoral de cobayos adultos que fueron gestados en normoxia y en hipoxia hipobárica crónica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la función vasoconstrictora y vasodilatadora ex vivo de la arteria carótida de cobayos adultos gestados en normoxia y en hipoxia hipobárica crónica.
- Determinar la función vasoconstrictora y vasodilatadora ex vivo de la arteria femoral de cobayos adultos gestados en normoxia y en hipoxia hipobárica crónica.
- Determinar las características morfoestructurales de la arteria carótida de cobayos adultos gestados en normoxia y en hipoxia hipobárica crónica.
- Determinar las características morfoestructurales de la arteria femoral de cobayos adultos gestados en normoxia y en hipoxia hipobárica crónica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este estudio se enmarca en el Proyecto Fondecyt Regular 1201283, “Reprogramming cardiovascular health after intrauterine hypoxia: epigenetics, antioxidants and endogenous gasotransmitters”, dirigido por el Dr. Emilio Herrera y que cuenta con la certificación bioética del Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de la Universidad de Chile (certificado CICUA, 20354 MED-UCH).

Animales

Para este estudio se utilizó un total de 21 cobayas (*Cavia porcellus*) gestantes de 4 meses de edad. El grupo control correspondió a animales gestados en normoxia (Nx; n=12; 580 msnm; PB=720 mmHg), de los cuales 8 fueron machos y 4 hembras, mientras que el grupo hipóxico se mantuvo en una cámara hipobárica (Hx; n=9; 3800 msnm, PB= 460 mmHg), a partir del día 30 de gestación, siendo 5 machos y 4 hembras en total. Luego del nacimiento, todos los animales se mantuvieron en condiciones ambientales estándar (normoxia) durante el período postnatal. A los 2,5 meses de edad (adulto joven), los animales se eutanasiaron mediante sobredosis anestésica (Pentotal Sódico, 50 mg/kg IP). Las arterias carótidas y femorales fueron recolectadas y montadas en un miógrafo de alambre, según los protocolos ya establecidos en el Laboratorio (Herrera y cols., 2007; Torres y cols., 2015; Figueroa y cols., 2021). Adicionalmente, segmentos arteriales fueron conservados para los estudios histológicos (Torres y cols., 2015; Astorga y cols., 2018).

Miografía de arterias carótidas y femorales

Las arterias fueron cortadas en anillos de ~2 mm de longitud, los que fueron montados en un miógrafo de alambre (DMT 610M, Danish Myo Technologies, Aarhus, Denmark). Durante el montaje y el experimento, los vasos se mantuvieron en una solución de Krebs cuya composición en mM es NaCl 118,5; NaHCO₃ 25; KCl 4,7; KH₂PO₄ 1,2; MgSO₄ 1,2; CaCl₂ 2,5; glucosa 5,5; pH 7,4, a 37°C, burbujeando con una mezcla

gaseosa de 95% O₂ y 5% CO₂. Cada anillo arterial fue estirado hasta su diámetro óptimo individual equivalente a una presión fisiológica de ~80 mmHg (Herrera y cols., 2010). Para evaluar la función vasoconstrictora, se realizaron curvas de concentración respuesta (CCR) a Potasio (K⁺; 6,25 -125 mM), fenilefrina (PE; 10⁻¹⁰-10⁻⁴), serotonina (5Ht; 10⁻¹⁰-10⁻⁴) y endotelina-1 (ET-1; 10⁻¹³-10⁻⁷). Luego, se determinó la respuesta a los vasodilatadores metacolina (MetCh) para evaluar la respuesta dependiente de endotelio y nitroprusiato de sodio (SNP) para evaluar la respuesta independiente de endotelio. Para el análisis, las CCR fueron ajustadas a una función de Boltzman (KCI) y de agonista-respuesta (PE, 5Ht, ET-1, MetCh, SNP), con las cuales se calculó la respuesta máxima (E_{max}, %K_{max}, %R_{max}) y la sensibilidad (EC₅₀ y pD₂). Para ET-1 específicamente los resultados se acompañaron del área bajo la curva (AUC). Para este análisis se utilizó el programa Prisma (Prism 8, GraphPad, USA) (Herrera y cols., 2010).

Histología de arterias carótidas y femorales

Los segmentos arteriales extraídos para histología se sumergieron en una solución de paraformaldehído al 4% durante 24 horas a 4°C, y luego se incluyeron en parafina. Posteriormente, estas muestras fueron cortadas en secciones de 5 µM de espesor. De las dos secciones arteriales, una fue sometida a la tinción de van Gieson para la determinación de la cantidad de colágeno y la otra fue sometida a la tinción de Hematoxilina-Eosina para el reconocimiento de estructura, separación de capas, conteo celular y el cálculo de dimensiones. Las secciones fueron fotografiadas en forma seriada en un microscopio óptico (Olympus, modelo BX51) adosado a una cámara digital vinculada al software Image Pro. Las fotos obtenidas fueron utilizadas para reconstruir la totalidad de la arteria con el programa Adobe Lightroom. Con las imágenes de cada arteria reconstruida, se realizó la medición de variables con el software Adobe Photoshop (Torres y cols., 2015; Astorga y cols., 2018).

Análisis estadístico

La capacidad contráctil analizada con KCl fue expresada como tensión de la pared (mN/mm), mientras que la respuesta a agentes vasoconstrictores se expresó como porcentaje de la respuesta submáxima a K^+ (40,8 mM). Para los vasodilatadores, la respuesta se expresó como el porcentaje de la tensión inducida por fenilefrina (10^{-6}). En cuanto al análisis morfoestructural, se determinó el diámetro externo, interno, espesor de las capas, densidad celular y porcentaje de colágeno en las diferentes capas vasculares. Las dimensiones de la pared vascular y sus capas se normalizaron a porcentaje para hacer comparables los resultados entre los grupos estudiados. Todos los resultados se sometieron a la prueba de Shapiro-Wilk para determinar la distribución de los datos. Se utilizó la prueba de t-test para aquellos datos que presentaron distribución normal y Mann-Whitney para los que no lo hicieron. Todos los resultados se expresaron como promedio \pm error estándar de la media (ESM), y las diferencias entre grupos se consideraron estadísticamente significativa cuando $p \leq 0,05$.

El mismo análisis fue aplicado al separar los grupos de estudio en subgrupos según sexo.

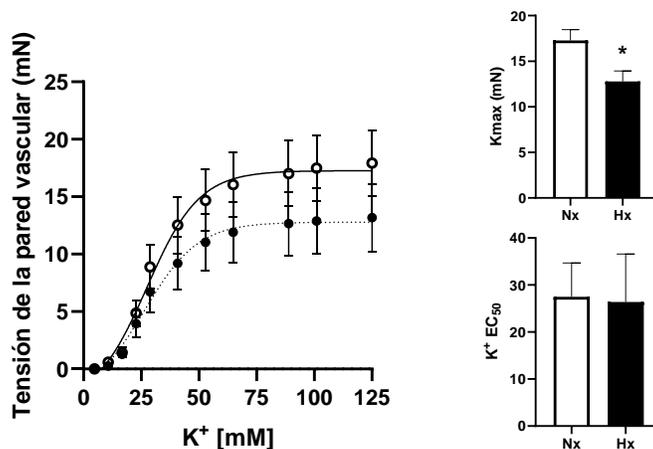
RESULTADOS

I. FUNCIÓN VASCULAR DE LA ARTERIA CARÓTIDA

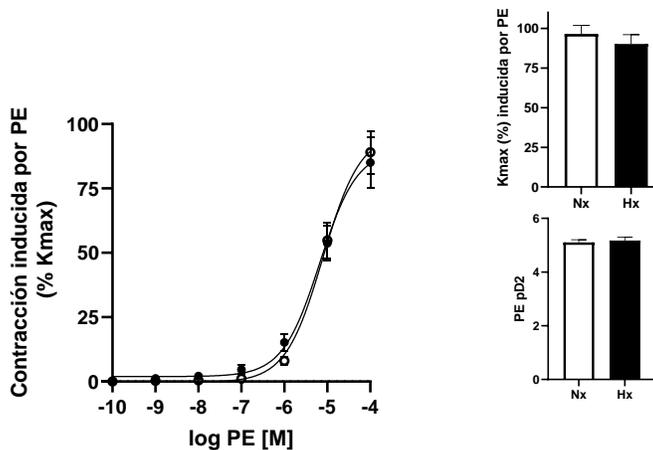
1.a. Función vasoconstrictora

Al analizar la respuesta contráctil de los animales, sin separar por sexo, la capacidad contráctil evidenciada por la respuesta máxima a KCl en las arterias carótidas hipóxicas fue menor en comparación con el grupo control. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en las sensibilidades ni en la respuesta contráctil frente a los agentes vasoconstrictores PE, 5Ht y ET-1 (Fig.1).

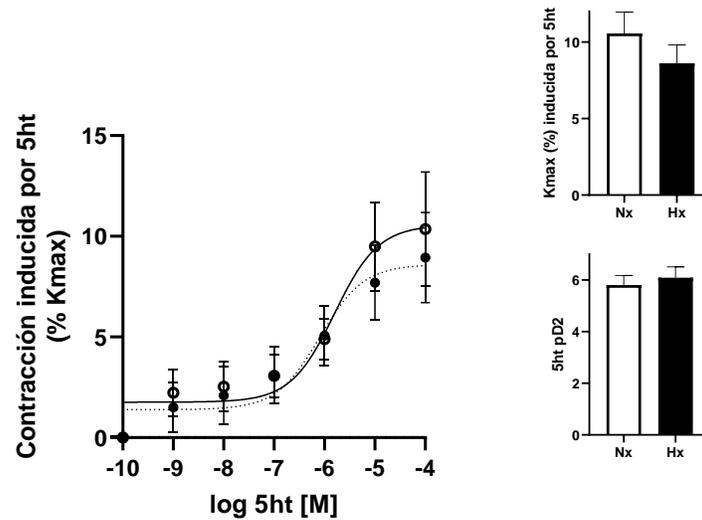
a.



b.



c.



d.

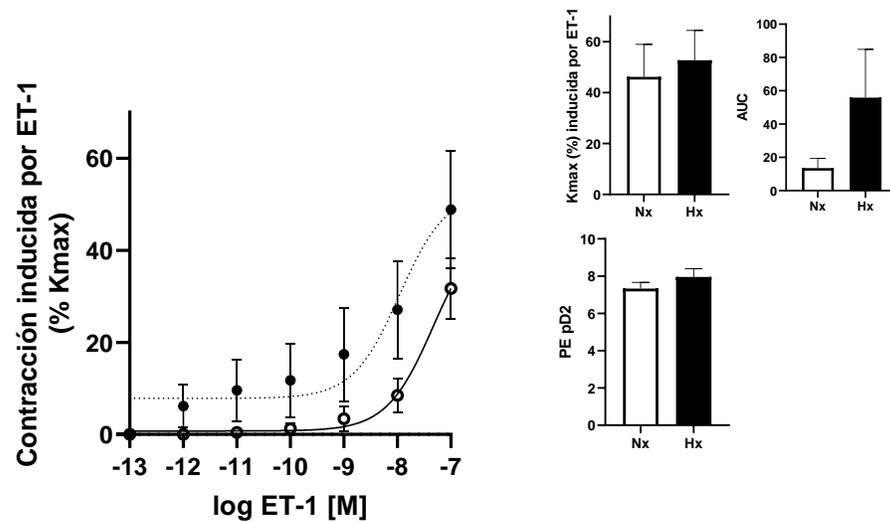
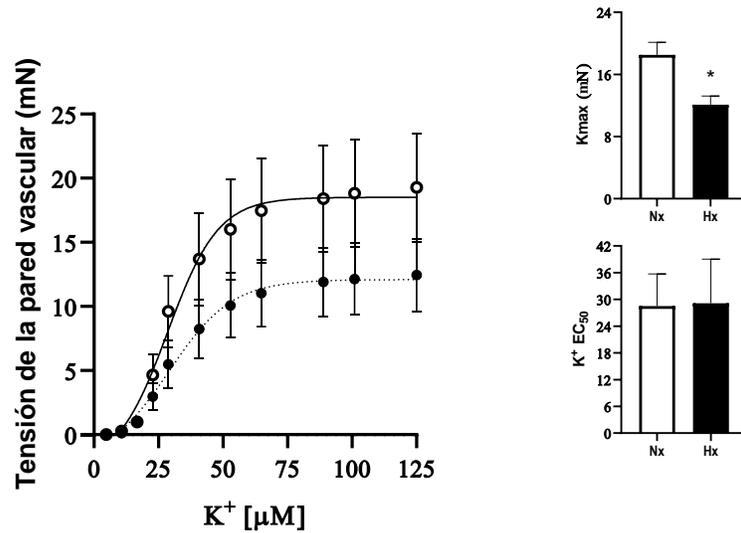


FIGURA 1. Función vasoconstrictora en arteria carótida. a. Respuesta vasoconstrictora a potasio (K^+) o capacidad contráctil arterial en cobayos adultos (Nx=12; Hx=9). **b.** Respuesta contráctil generada por fenilefrina (PE) (Nx=12; Hx=8). **c.** Respuesta contráctil generada por serotonina (5ht) (Nx=11; Hx=9). **d.** Respuesta contráctil generada por endotelina-1 (ET-1) (Nx=8; Hx=8). Para la figura b, c y d, los valores se expresan en porcentaje y tienen relación con el valor entregado por la contracción sub-máxima generada por KCl a 40,80 mM de concentración. En a, b, c y d, los histogramas insertados corresponden a respuesta contráctil máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). En d, el histograma insertado a la derecha superior corresponde al área bajo la curva (AUC) de las curvas de respuesta contráctil a ET-1. t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

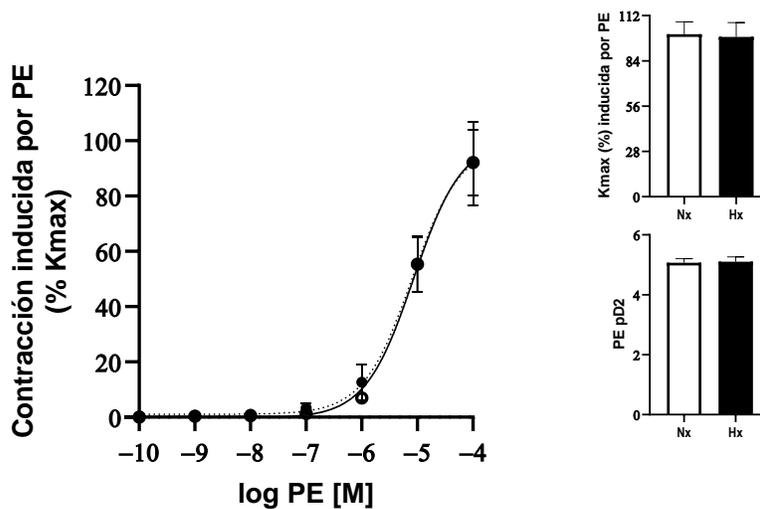
1.b. Función vasoconstrictora en machos

En los machos, la capacidad contráctil (respuesta máxima a KCl) en las arterias carótidas hipóxicas fue menor en comparación con el grupo control. También disminuyó la respuesta contráctil máxima de la arteria hipóxica al inducir la contracción con serotonina (5ht). En contraste, no hubo diferencias significativas en las sensibilidades, ni en las respuestas a PE y ET-1 (Fig. 2).

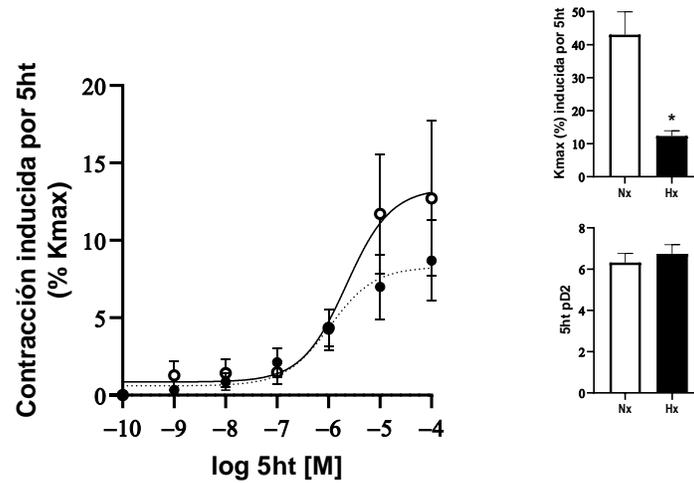
a.



b.



c.



d.

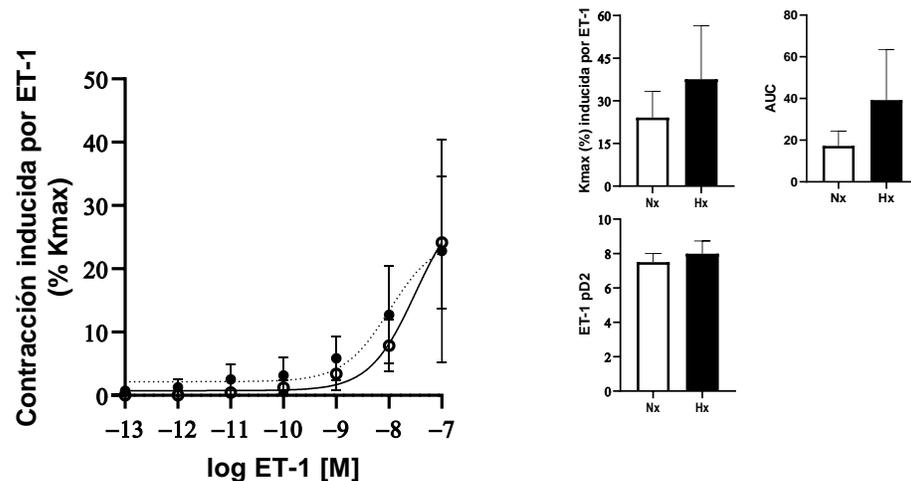
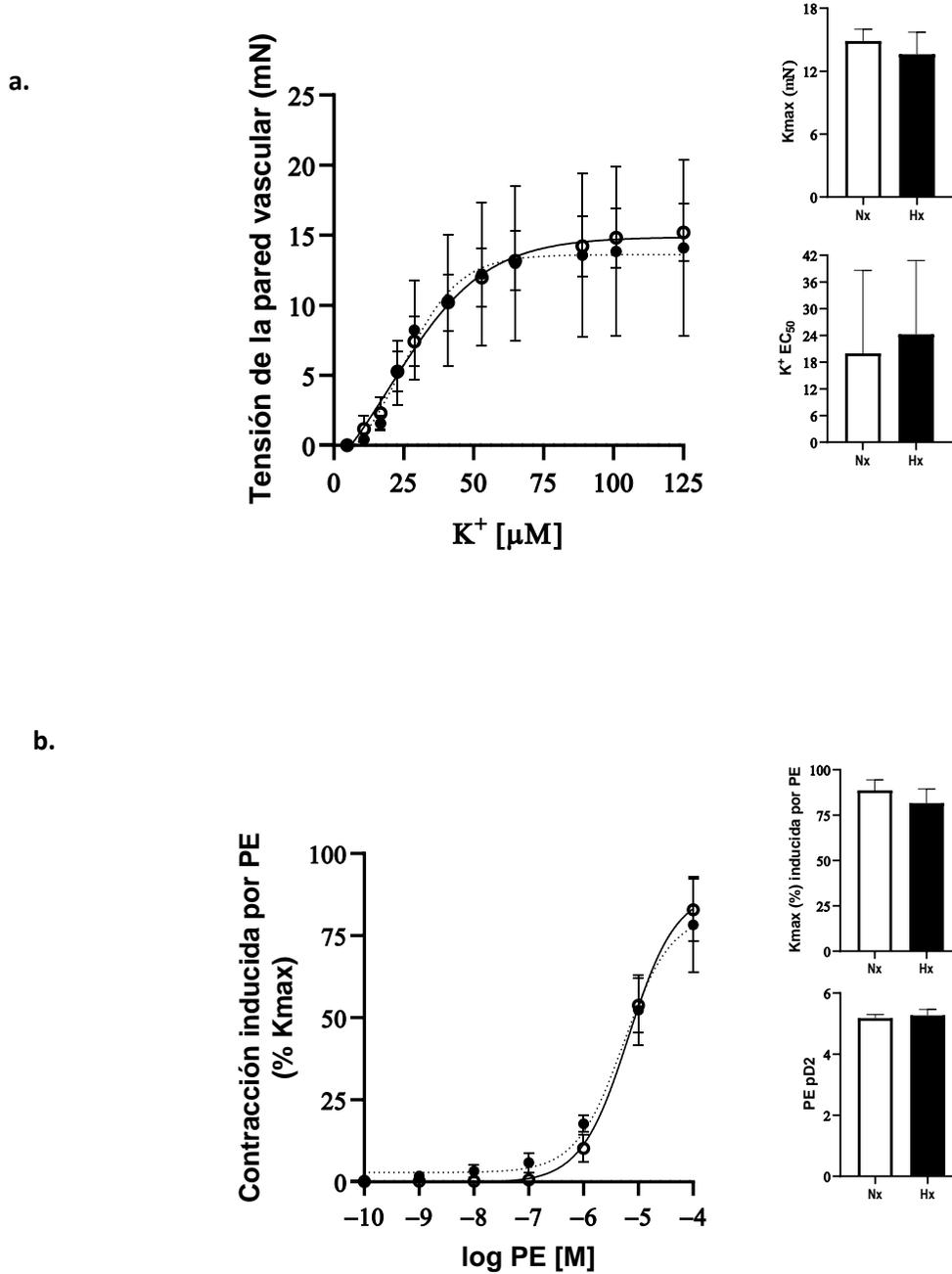


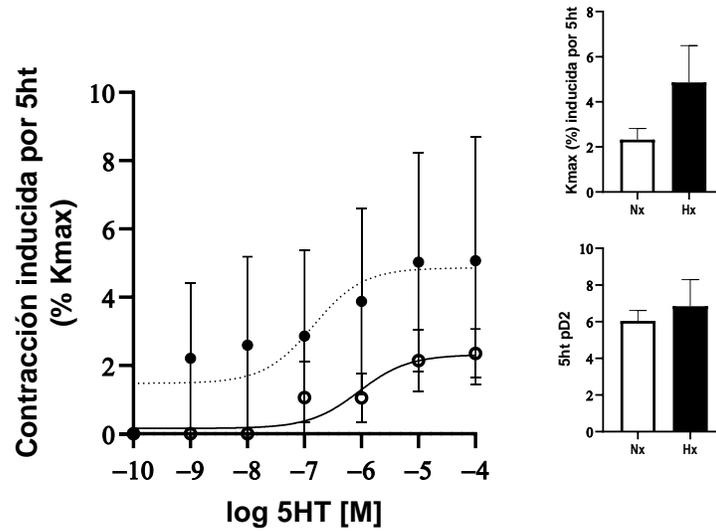
FIGURA 2. Función vasoconstrictora en arteria carótida en machos. a. Respuesta vasoconstrictora a potasio (K^+) o capacidad contráctil arterial en cobayos adultos (Nx=8; Hx=5). **b.** Respuesta contráctil generada por fenilefrina (PE) (Nx=8; Hx=4). **c.** Respuesta contráctil generada por serotonina (5ht) (Nx=7; Hx=5). **d.** Respuesta contráctil generada por endotelina-1 (ET-1) (Nx=4; Hx=4). Para la figura b, c y d, los valores se expresan en porcentaje y tienen relación con el valor entregado por la contracción sub-máxima generada por KCl a 40,80 mM de concentración. En a, b, c y d, los histogramas insertados corresponden a respuesta contráctil máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). En d, el histograma insertado a la derechas superior corresponde al área bajo la curva (AUC) de las curvas de respuesta contráctil a ET-1. t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

1.c. Función vasoconstrictora en hembras

La capacidad contráctil de las arterias carótidas de las hembras fue similar entre grupos. A la vez, no hubo diferencias en la respuesta contráctil o en las sensibilidades de los agentes vasoconstrictores (Fig. 3).



c.



d.

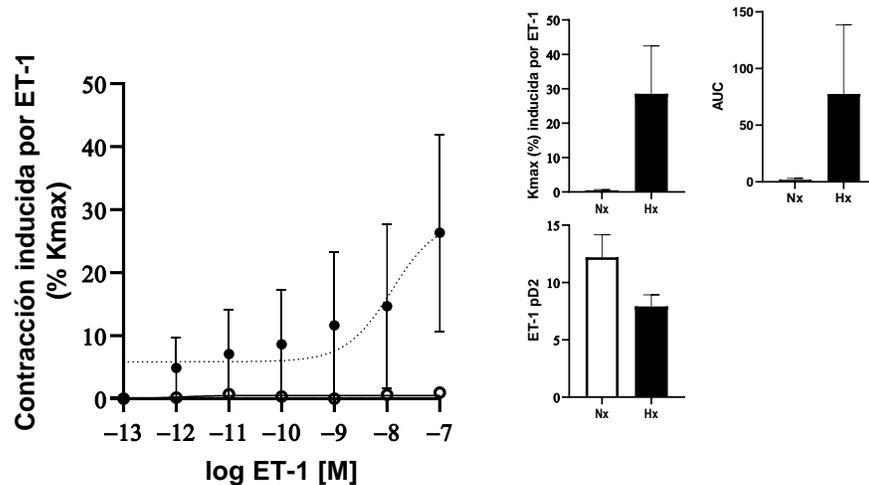
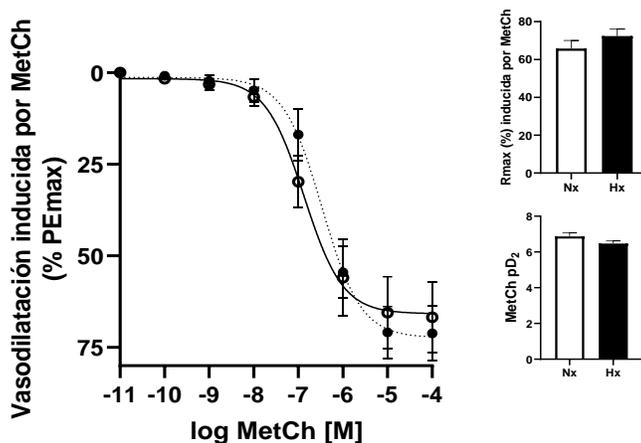


FIGURA 3. Función vasoconstrictora en arteria carótida en hembras. a. Respuesta vasoconstrictora a potasio (K^+) o capacidad contráctil arterial en cobayos adultos (Nx=4; Hx=4). b. Respuesta contráctil generada por fenilefrina (PE) (Nx=4; Hx=4). c. Respuesta contráctil generada por serotonina (5ht) (Nx=4; Hx=4). d. Respuesta contráctil generada por endotelina-1 (ET-1) (Nx=4; Hx=4). Para la figura b, c y d, los valores se expresan en porcentaje y tienen relación con el valor entregado por la contracción sub-máxima generada por KCl a 40,80 mM de concentración. En a, b, c y d, los histogramas insertados corresponden a respuesta contráctil máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). En d, el histograma insertado a la derechas superior corresponde al área bajo la curva (AUC) de las curvas de respuesta contráctil a ET-1 t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

2.a. Función vasodilatadora

El análisis de las respuestas sin separar por sexo no mostró diferencias en la respuesta vasodilatadora inducida por metacolina (MetCh) y por nitroprusiato de sodio (SNP) (Fig. 4).

a.



b.

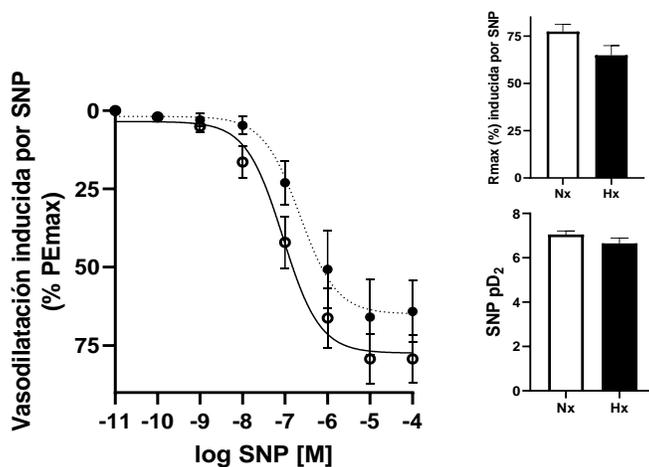


FIGURA 4. Función vasodilatadora en arteria carótida. a. Respuesta vasodilatadora a metacolina (MetCh) en cobayos adultos (Nx=12; Hx=9). **b.** Se muestra la respuesta vasodilatadora a SNP en cobayos adultos (Nx=11; Hx=8). Los histogramas insertados corresponden a respuesta vasodilatadora máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

2.b. Función vasodilatadora en machos

Al evaluar la respuesta específica de machos, la sensibilidad a MetCh fue menor en la arteria hipóxica (Fig. 5a). Respecto a la vasodilatación inducida por nitroprusiato de sodio (SNP), esta mostró una respuesta vasodilatadora máxima y sensibilidad menor en la arteria hipóxica (Fig.5b).

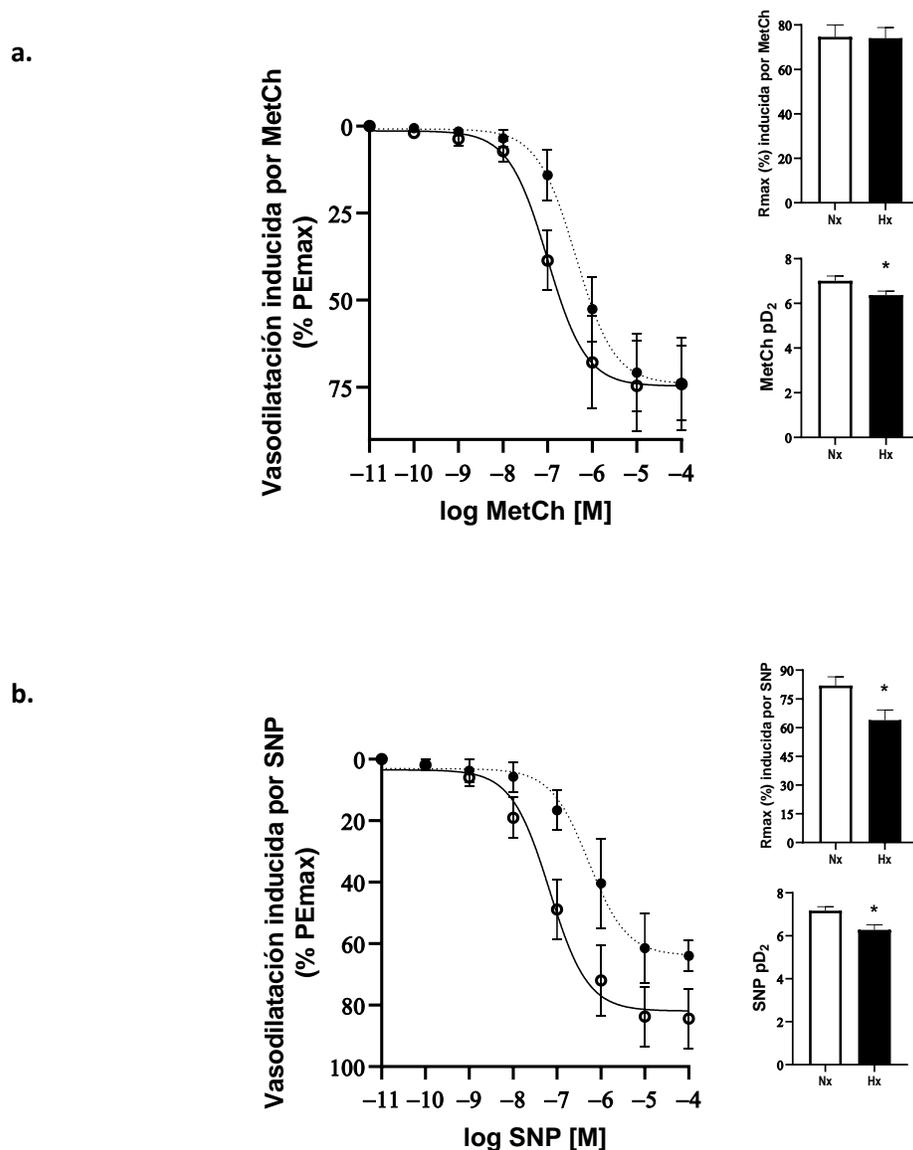
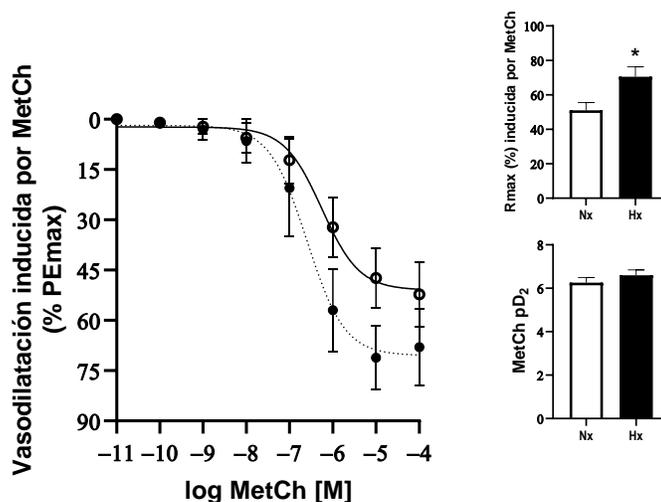


FIGURA 5. Función vasodilatadora en arteria carótida en machos. a. Respuesta vasodilatadora a metacolina (MetCh) en cobayos adultos (Nx=8; Hx=5). **b.** Se muestra la respuesta vasodilatadora a SNP en cobayos adultos (Nx=8; Hx=4). Los histogramas insertados corresponden a respuesta vasodilatadora máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

2.c. Función vasodilatadora en hembras

La respuesta vasodilatadora inducida por metacolina (MetCh) en hembras fue mayor en la arteria hipóxica, sin cambios en la sensibilidad (Fig. 6a). En contraste, la respuesta a SNP no presentó diferencias significativas en la respuesta máxima inducida ni en la sensibilidad.

a.



b.

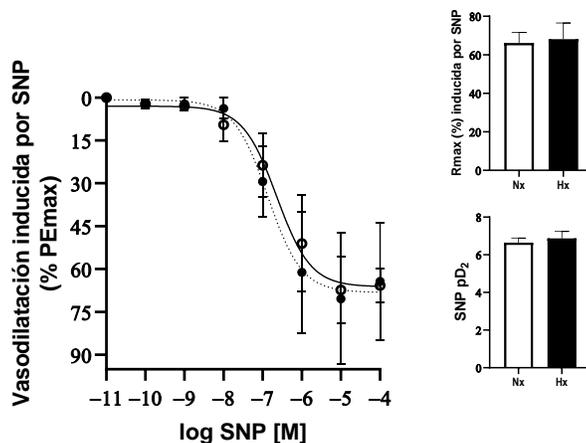


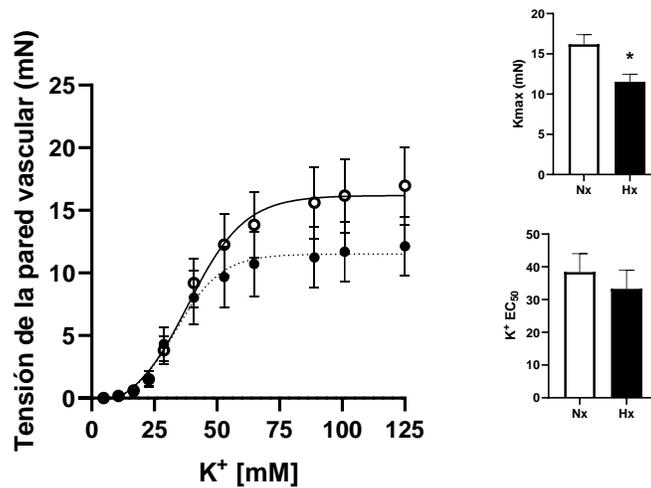
FIGURA 6. Función vasodilatadora en arteria carótida en hembras. a. Respuesta vasodilatadora a metacolina (MetCh) en cobayos adultos (Nx=4; Hx=4). b. Se muestra la respuesta vasodilatadora a SNP en cobayos adultos (Nx=3; Hx=4). Los histogramas insertados corresponden a respuesta vasodilatadora máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p < 0,05$): * vs Nx.

II. FUNCIÓN VASCULAR DE LA ARTERIA FEMORAL

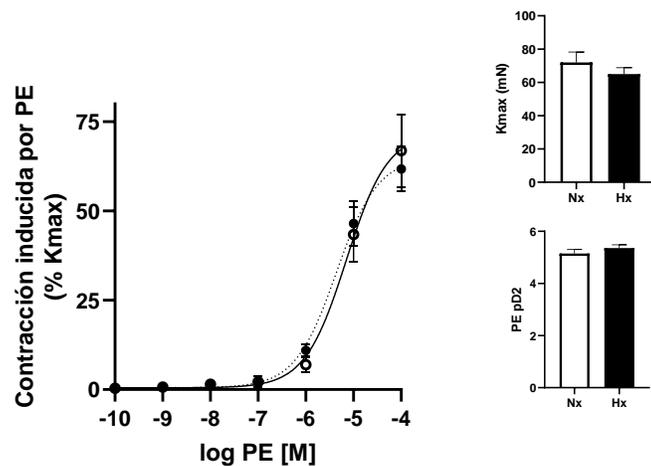
3.a. Función vasoconstrictora de arteria femoral

La capacidad contráctil evidenciada por la respuesta máxima a KCl en las arterias femorales hipóxicas fue menor en comparación con el grupo control (Fig.7a). Sin embargo, no hubo cambios significativos en las respuestas evocadas por los otros agentes vasoconstrictores (Fig. 7 b, c y d).

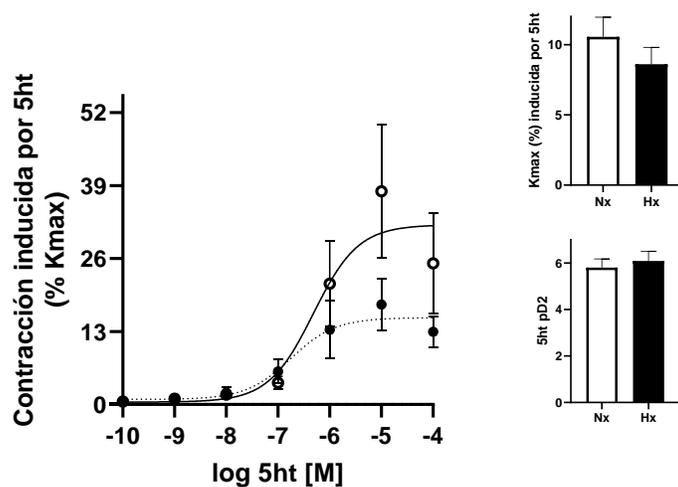
a.



b.



c.



d.

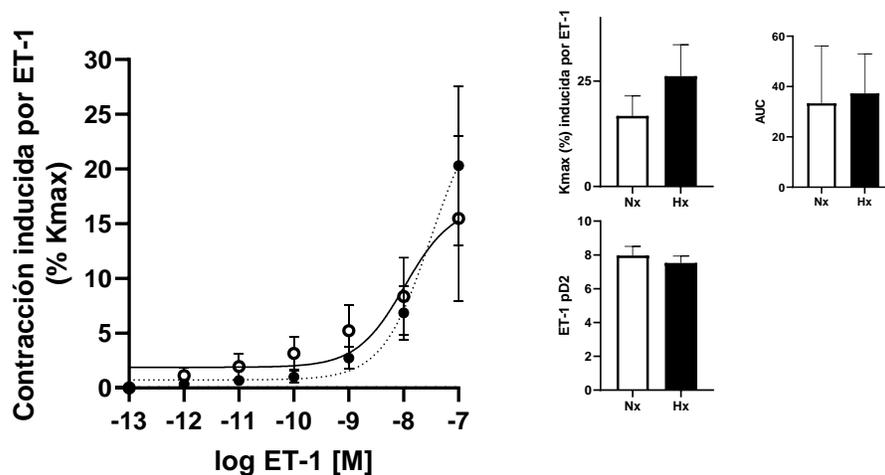
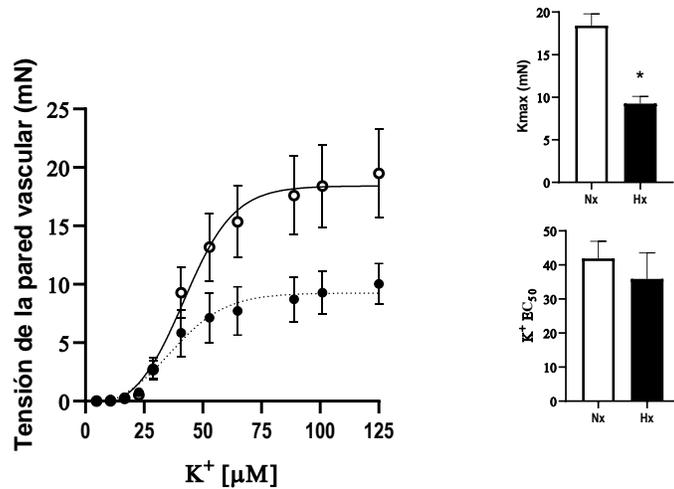


FIGURA 7. Función vasoconstrictora en arteria femoral. a. Respuesta vasoconstrictora a potasio (K^+) o capacidad contráctil arterial en cobayos adultos (Nx=11; Hx=9). b. Respuesta contráctil generada por fenilefrina (PE) (Nx=11; Hx=9). c. Respuesta contráctil generada por serotonina (5ht) (Nx=11; Hx=7). d. Respuesta contráctil generada por endotelina-1 (ET-1) (Nx=9; Hx=8). Para la figura b, c y d, los valores se expresan en porcentaje y tienen relación con el valor entregado por la contracción submáxima generada por KCl a 40,80 mM de concentración. En a, b, c y d, los histogramas insertados corresponden a respuesta contráctil máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). En d, el histograma insertado a la derechas superior corresponde al área bajo la curva (AUC) de las curvas de respuesta contráctil a ET-1t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

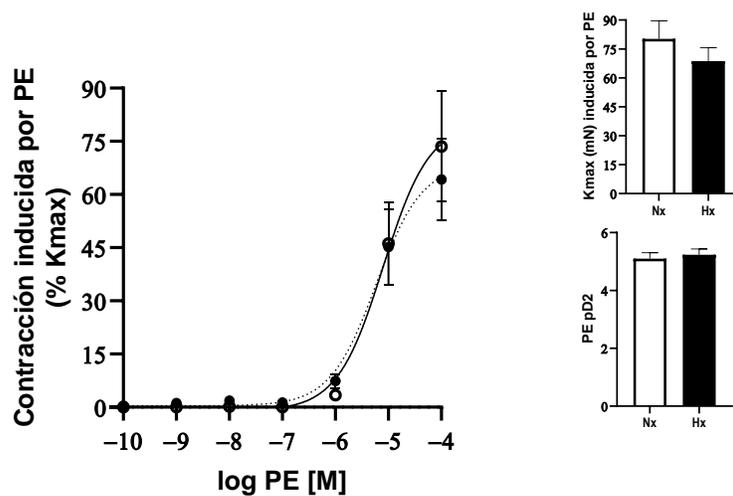
3.b. Función vasoconstrictora de arteria femoral en machos

Al realizar la evaluación específica en machos, la capacidad contráctil evidenciada por la respuesta máxima a KCl en las arterias femorales hipóxicas fue menor en comparación con el grupo control (Fig.8a). Adicionalmente la respuesta contráctil inducida por serotonina (5ht) fue significativamente menor en el grupo hipóxico respecto al grupo control. Las sensibilidades no mostraron diferencias significativas (Fig. 8).

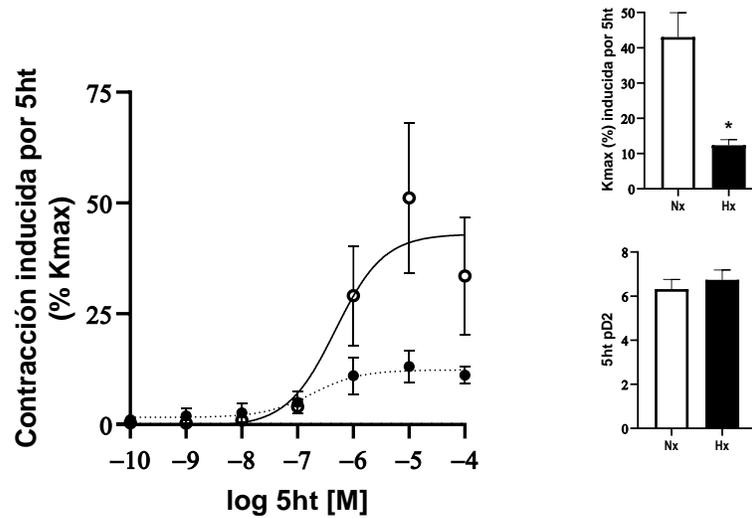
a.



b.



c.



d.

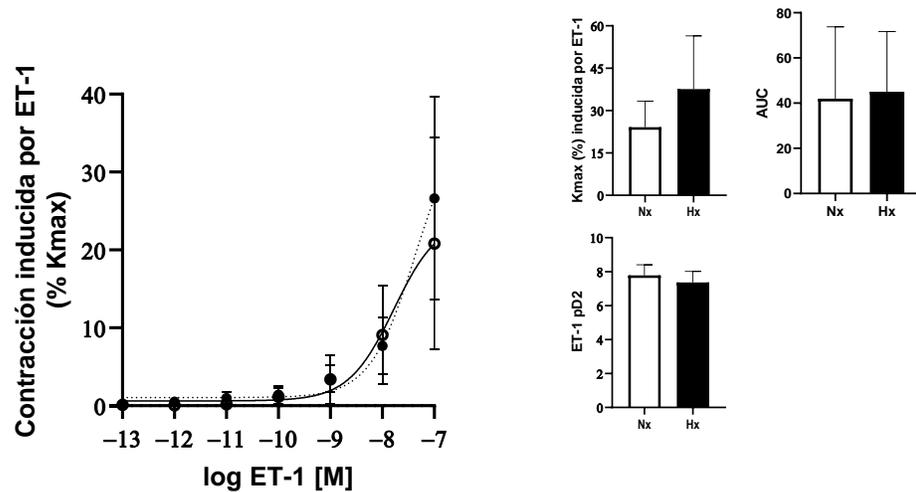
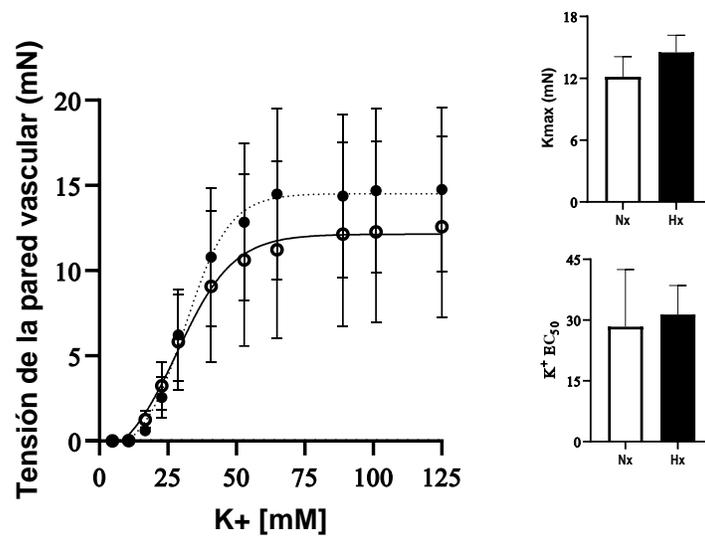


FIGURA 8. Función vasoconstrictora en arteria femoral en machos. a. Respuesta vasoconstrictora a potasio (K^+) o capacidad contráctil arterial en cobayos adultos (Nx=7; Hx=5). b. Respuesta contráctil generada por fenilefrina (PE) (Nx=7; Hx=5). c. Respuesta contráctil generada por serotonina (5ht) (Nx=7; Hx=3). d. Respuesta contráctil generada por endotelina-1 (ET-1) (Nx=5; Hx=4). Para la figura b, c y d, los valores se expresan en porcentaje y tienen relación con el valor entregado por la contracción sub-máxima generada por KCl a 40,80 mM de concentración. En a, b, c y d, los histogramas insertados corresponden a respuesta contráctil máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). En d, el histograma insertado a la derecha superior corresponde al área bajo la curva (AUC) de las curvas de respuesta contráctil a ET-1 t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

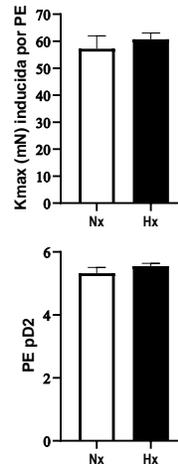
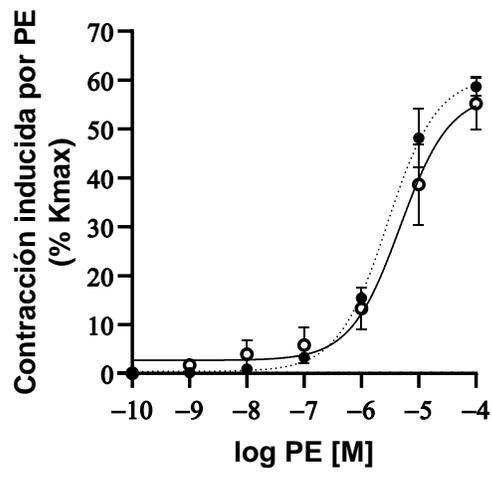
3.c. Función vasoconstrictora de arteria femoral en hembras

La capacidad contráctil femoral en hembras fue similar entre el grupo control e hipóxico. Además, no hubo diferencias en la respuesta máxima al utilizar agentes vasoconstrictores (Fig. 9). En contraste, la sensibilidad solo mostró diferencias significativas al utilizar ET-1 en las arterias hipóxicas vs las normóxicas, lo que generó una mayor área bajo la curva para el grupo Hx (Fig. 9d).

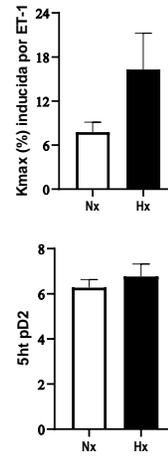
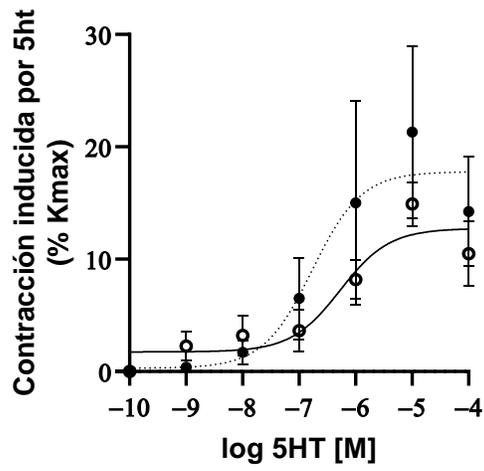
a.



b.



c.



d.

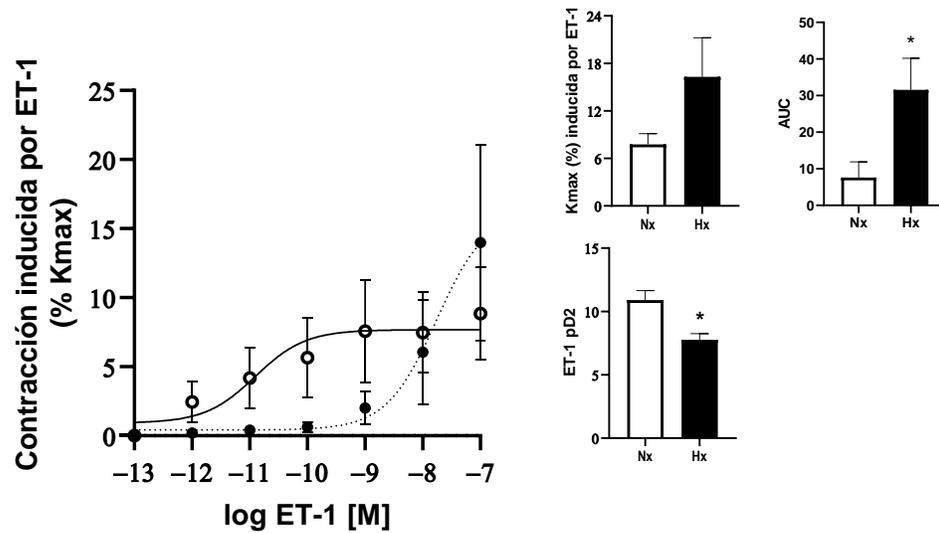
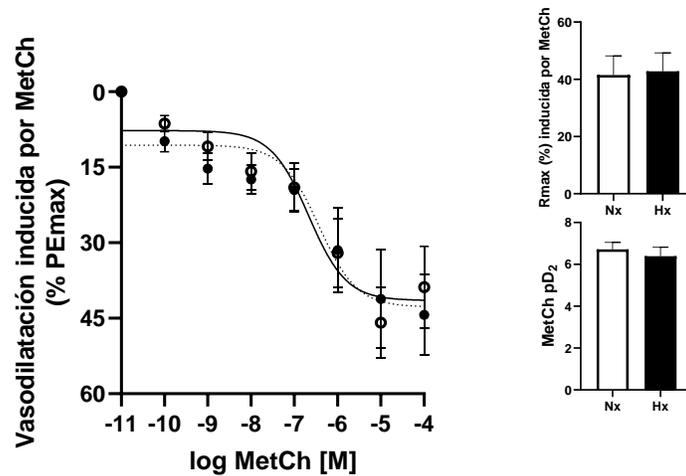


FIGURA 9. Función vasoconstrictora en arteria femoral en hembras. **a.** Respuesta vasoconstrictora a potasio (K^+) o capacidad contráctil arterial en cobayos adultos (Nx=4; Hx=4). **b.** Respuesta contráctil generada por fenilefrina (PE) (Nx=4; Hx=4). **c.** Respuesta contráctil generada por serotonina (5ht) (Nx=4; Hx=4). **d.** Respuesta contráctil generada por endotelina-1 (ET-1) (Nx=4; Hx=4). Para la figura b, c y d, los valores se expresan en porcentaje y tienen relación con el valor entregado por la contracción sub-máxima generada por KCl a 40,80 mM de concentración. En a, b, c y d, los histogramas insertados corresponden a respuesta contráctil máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). En d, el histograma insertado a la derecha superior corresponde al área bajo la curva (AUC) de las curvas de respuesta contráctil a ET-1 t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

4.a. Función vasodilatadora de arteria femoral

La respuesta vasodilatadora inducida por MetCh y por SNP, no tuvo diferencias significativas ni en su respuesta máxima ni en la sensibilidad entre grupos (Fig. 10).

a.



b.

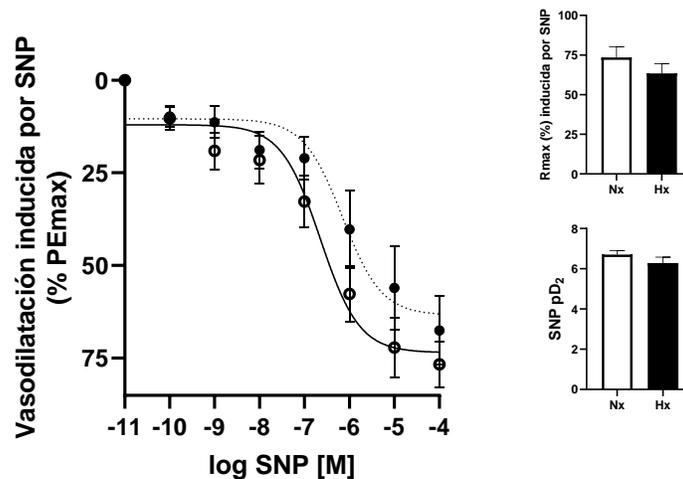


FIGURA 10. Función vasodilatadora en arteria femoral. a. Respuesta vasodilatadora a metacolina (MetCh) en cobayos adultos (Nx=11; Hx=9). **b.** Se muestra la respuesta vasodilatadora a SNP en cobayos adultos (Nx=10; Hx=8). Los histogramas insertados corresponden a respuesta vasodilatadora máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

4.b. Función vasodilatadora de arteria femoral en machos

La respuesta vasodilatadora a MetCh y a SNP, no tuvo diferencias entre grupos para la relajación máxima ni tampoco en la sensibilidad en machos adultos (Fig. 11).

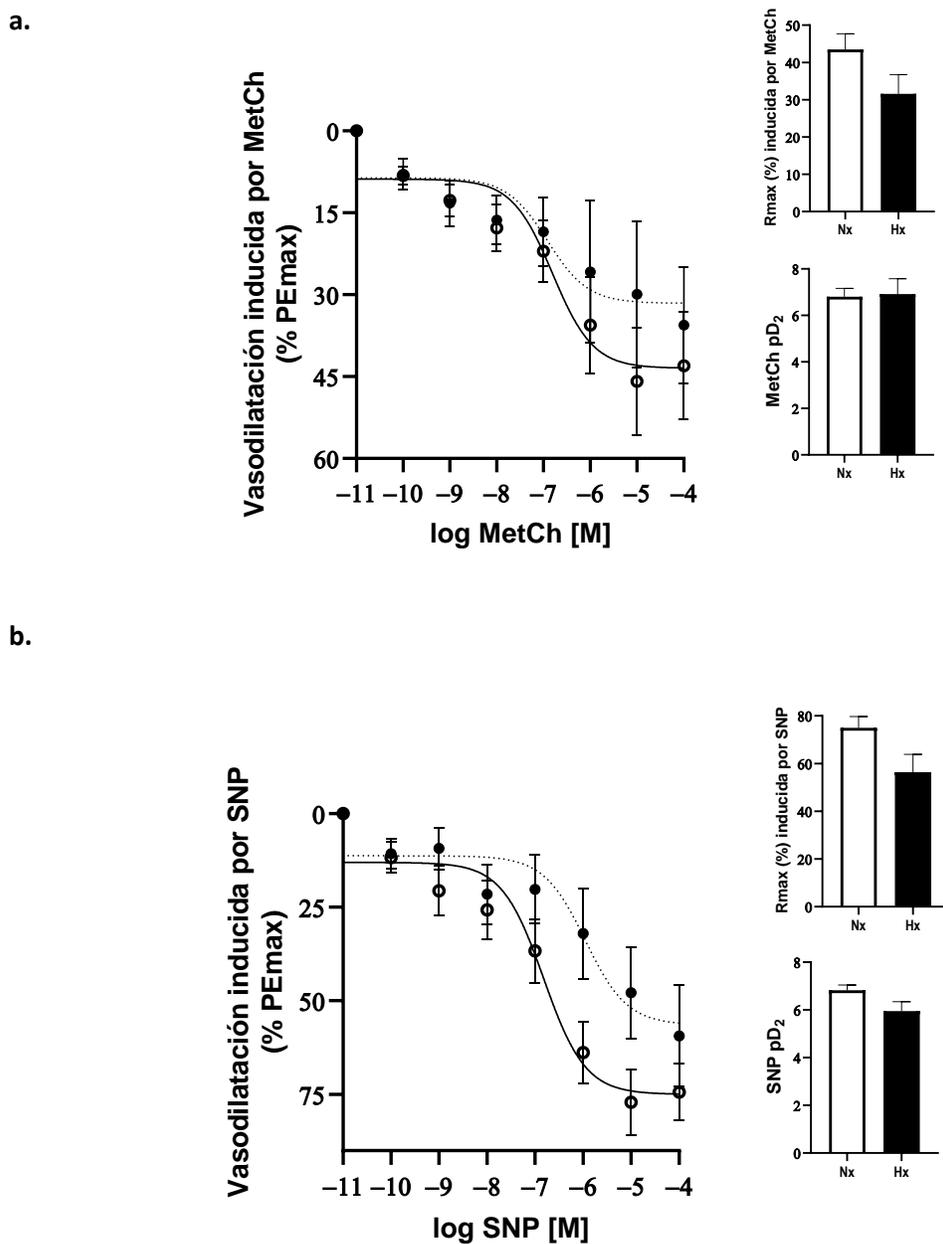
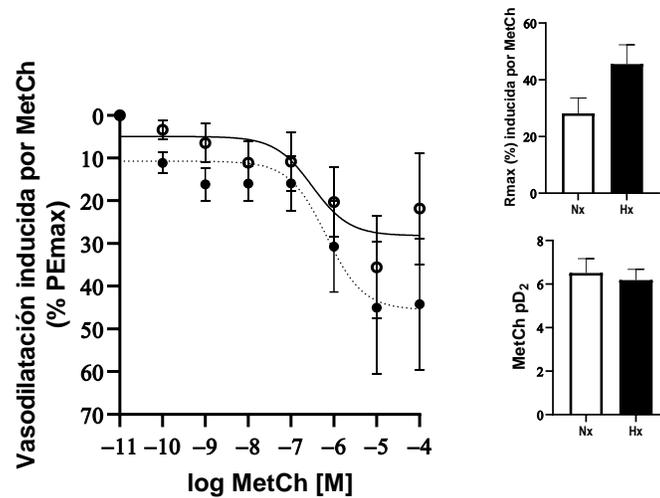


FIGURA 11. Función vasodilatadora en arteria femoral en machos. A. Respuesta vasodilatadora a metacolina (MetCh) en cobayos adultos (Nx=7; Hx=5). **B.** Se muestra la respuesta vasodilatadora a SNP en cobayos adultos (Nx=7; Hx=4). Los histogramas insertados corresponden a respuesta vasodilatadora máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

4.c. Función vasodilatadora de arteria femoral en hembras

La respuesta vasodilatadora a MetCh y a SNP en hembras, no tuvo diferencias entre grupos para la relajación máxima ni tampoco en la sensibilidad (Fig. 12).

a.



b.

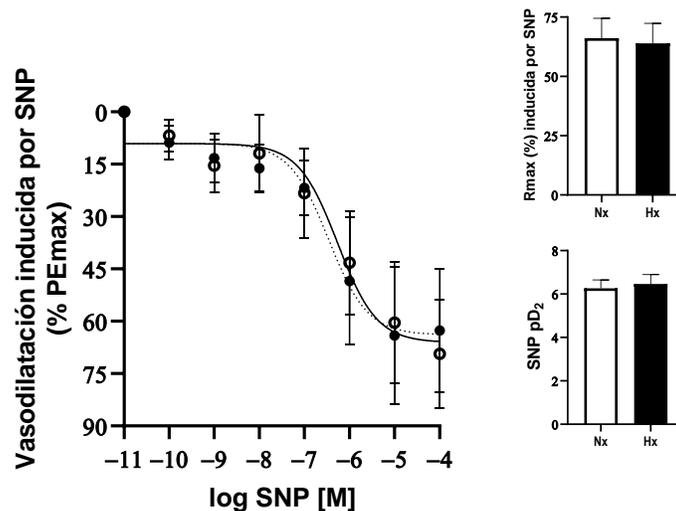


FIGURA 12. Función vasodilatadora en arteria femoral en hembras. a. Respuesta vasodilatadora a metacolina (MetCh) en cobayos adultos (Nx=4; Hx=4). b. Se muestra la respuesta vasodilatadora a SNP en cobayos adultos (Nx=3; Hx=4). Los histogramas insertados corresponden a respuesta vasodilatadora máxima inducida (histograma superior) y la sensibilidad (histograma inferior). t-test fue utilizada como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

III. CARACTERÍSTICAS MORFOESTRUCTURALES DE LAS ARTERIAS

5.a. Características morfoestructurales de la arteria carótida

Las arterias carótidas analizadas del grupo hipóxico mostraron una mayor área total y un mayor diámetro externo de forma significativa con preservación del diámetro luminal, comparado con el grupo control (imagen 1) (fig. 13 a, b y c). Además, no se encontró diferencias en el espesor de la pared vascular, expresado como porcentaje del área total de la arteria. Sin embargo, la pared vascular cambió la proporción de las capas, disminuyendo la capa media y aumentando la capa adventicia en las arterias carótidas del grupo hipóxico, con menor *vasa vasorum* (fig. 13 d, e y f). El grupo hipóxico presentó además disminución de la densidad endotelial (imagen 2), aumento de la densidad de células musculares lisas en la capa media (imagen 3) y disminución del *vasa vasorum* en la capa adventicia de forma significativa (imagen 4) (Fig. 13 g, h e i). A la vez, se encontró que el colágeno en el grupo hipóxico se encuentra disminuido de forma significativa a costa de la disminución tanto en la capa media como en la capa adventicia (imagen 5) (fig.14 a, b y c).

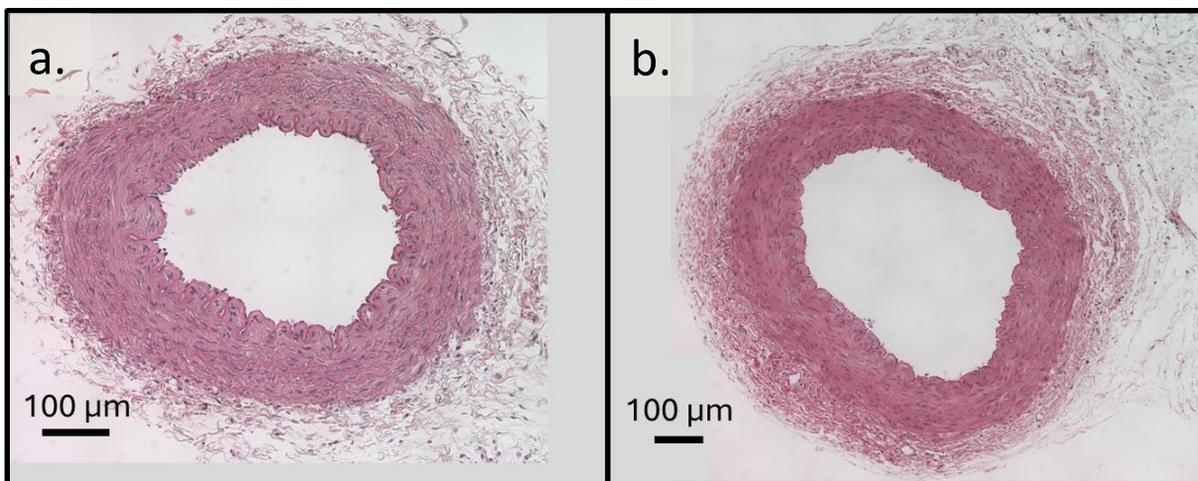
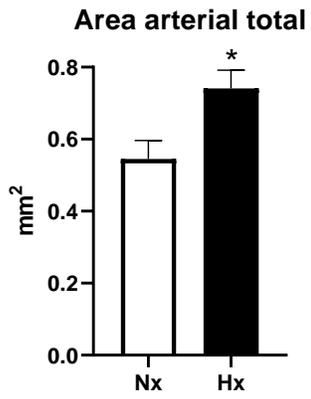
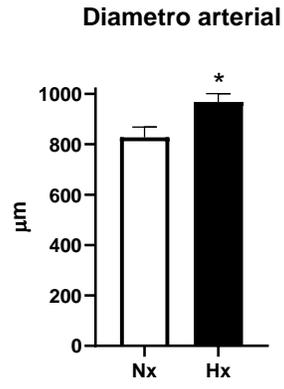


Imagen 1. Arteria carótida bajo tinción de Hematoxilina Eosina. Microfotografías representativas de arterias carótidas (40x) a. Arteria de macho normóxico, b. Arteria de macho hipóxico. Para cada imagen, en la esquina inferior izquierda se detalla la escala.

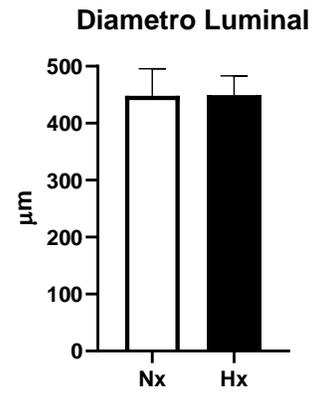
a.



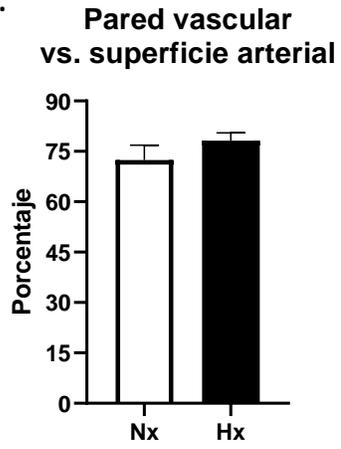
b.



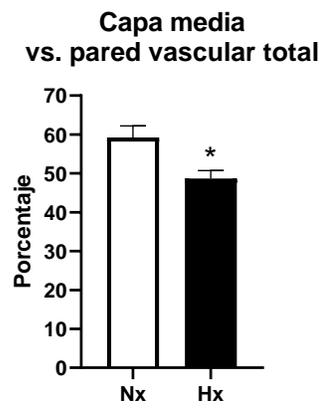
c.



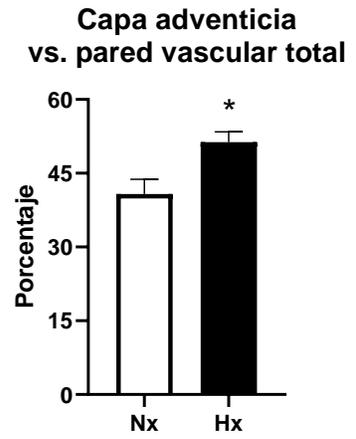
d.



e.



f.



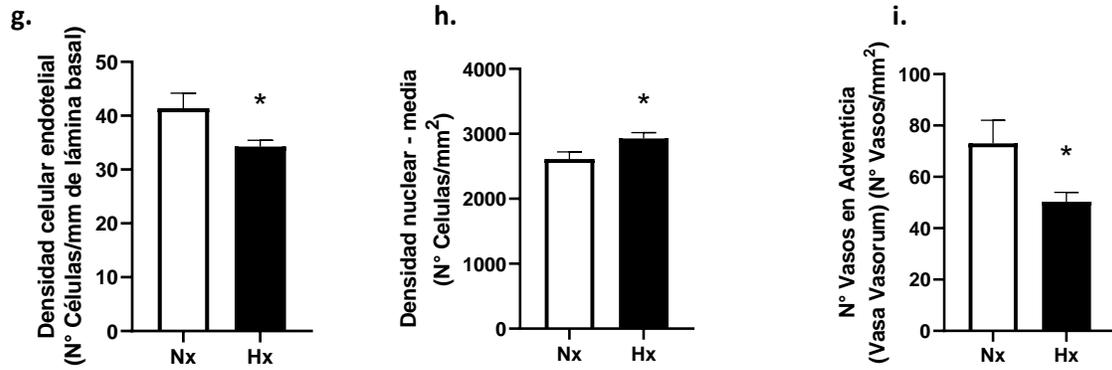


FIGURA 13. Características morfoestructurales de la arteria carótida. Los histogramas muestran el área total (a), diámetro externo (b), diámetro interno o luminal (c), porcentaje que representa la pared vascular en relación a la arteria completa (d), porcentaje que representa la capa media en relación a la totalidad de la pared vascular (e), porcentaje que representa la capa adventicia en relación a la pared vascular en su totalidad (f), densidad celular endotelial (g), densidad nuclear de la capa media (h), densidad vascular en la capa adventicia o *vasa vasorum* (i), de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 7 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 7 animales, símbolos-barras negras). Para todos los casos se utilizó t-test. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

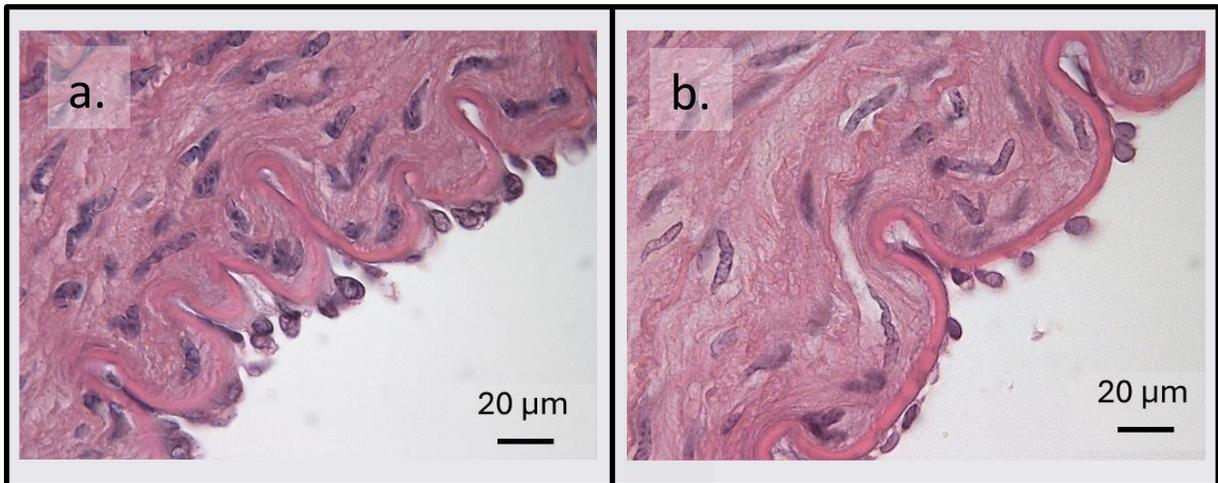


Imagen 2. Endotelio de arterias carótidas bajo tinción de Hematoxilina Eosina. Microfotografías representativas de endotelio de arterias carótidas (100x). a. Arteria normóxica, b. Arteria hipóxica. Para cada imagen, en la esquina inferior derecha se detalla la escala.

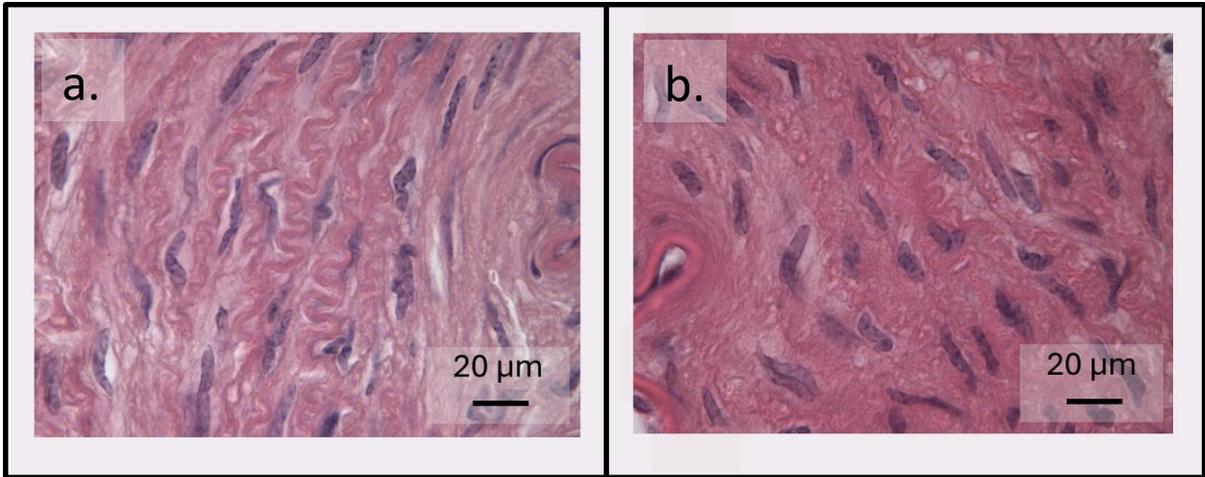


Imagen 3. Capa media de arterias carótidas bajo tinción de Hematoxilina Eosina. Microfotografías representativas de capa media de arterias carótidas (100x). a. Arteria normóxica. b. Arteria hipóxica. Para cada imagen, en la esquina inferior derecha se detalla la escala.

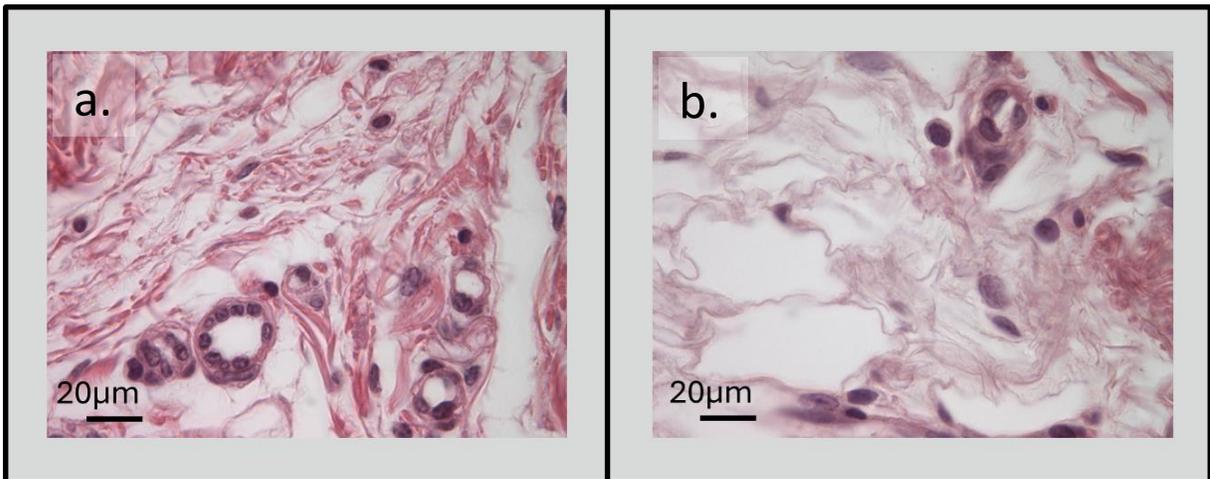


Imagen 4. Capa adventicia de arterias carótidas bajo tinción de Hematoxilina Eosina. Microfotografías representativas de capa adventicia de arterias carótidas (100x). a. *vasa vasorum* Arteria normóxica. b. *vasa vasorum* Arteria hipóxica. Para cada imagen, en la esquina inferior izquierda se detalla la escala.

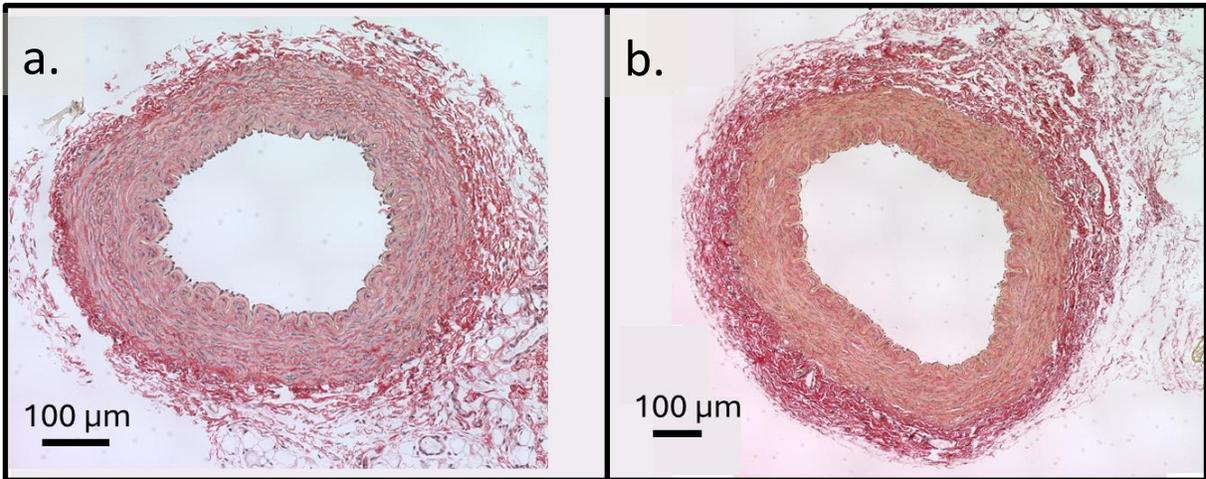


Imagen 5. Arteria carótida bajo tinción de Van Gieson. Las mismas arterias carótidas representativas mostrada en imagen 1 esta vez bajo esta tinción (40x). a. Arteria de macho normóxico. b. Arteria de macho hipóxico. Para cada imagen, en la esquina inferior izquierda se detalla la escala.

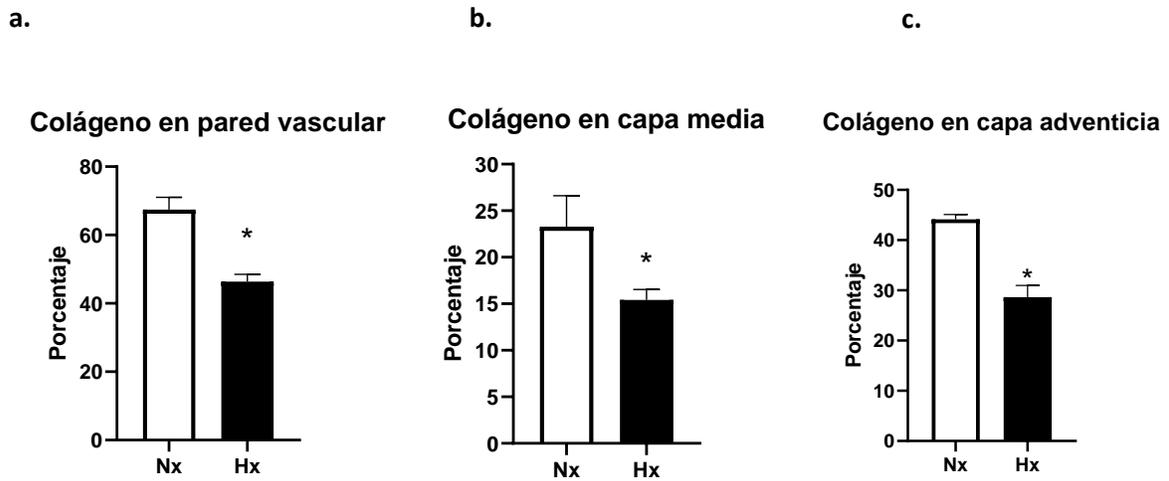
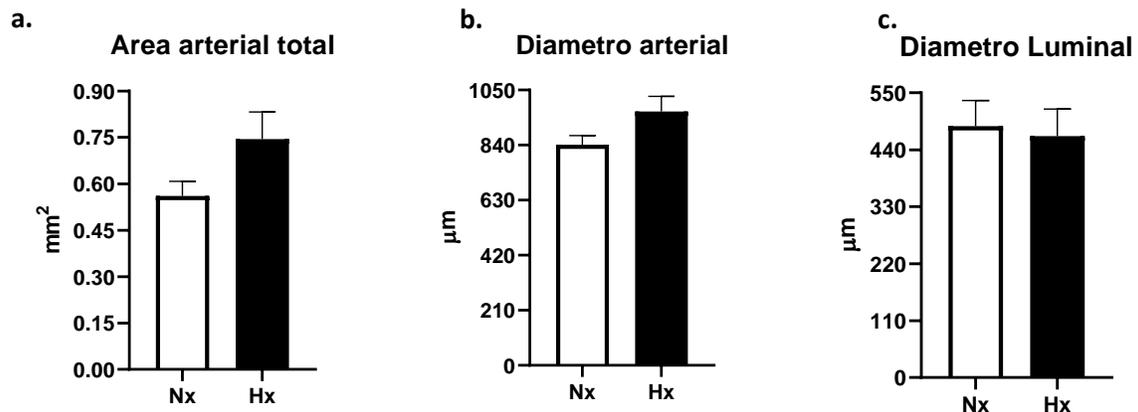


FIGURA 14. Características morfoestructurales relacionadas con la composición de colágeno de la arteria carótida. Los histogramas muestran: el porcentaje de colágeno en la pared vascular arterial total (a), el porcentaje de colágeno de colágeno en la capa media (b) y el porcentaje de colágeno en la capa adventicia (c) de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 6 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 7 animales, símbolos-barras negras). Para (a) y (c) se utilizó t-test como prueba estadística y en el caso de (b) se utilizó Mann-Whitney. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

5.b. Características morfoestructurales de la arteria carótida en machos

Al analizar el grupo de arterias carótidas de machos, no se encontró diferencias significativas en el tamaño de las arterias de ambos grupos: no hubo cambios en el diámetro externo ni tampoco en el diámetro luminal (fig. 15 a, b y c). Tampoco existió diferencia significativa en el porcentaje de ocupación de la pared vascular con relación al área arterial total estudiada (fig. 15 d). Sin embargo, si hubo diferencias significativas en la composición de la pared vascular, disminuyendo la capa media y aumentando la capa adventicia (Fig. 15 e y f). Adicionalmente, el grupo de arterias hipóxicas presentó una disminución significativa de la densidad celular endotelial acompañado de una disminución del *vasa vasorum* de la capa adventicia, sin cambios en la densidad celular de la capa media (Fig. 15 g, h e i). En cuanto al colágeno, el grupo hipóxico de machos replica lo ocurrido en el análisis global, en que existe una disminución porcentual de la presencia de colágeno en la pared vascular a costa de haber disminuido de forma significativa en la capa media y en la capa adventicia (fig. 16 a, b y c).



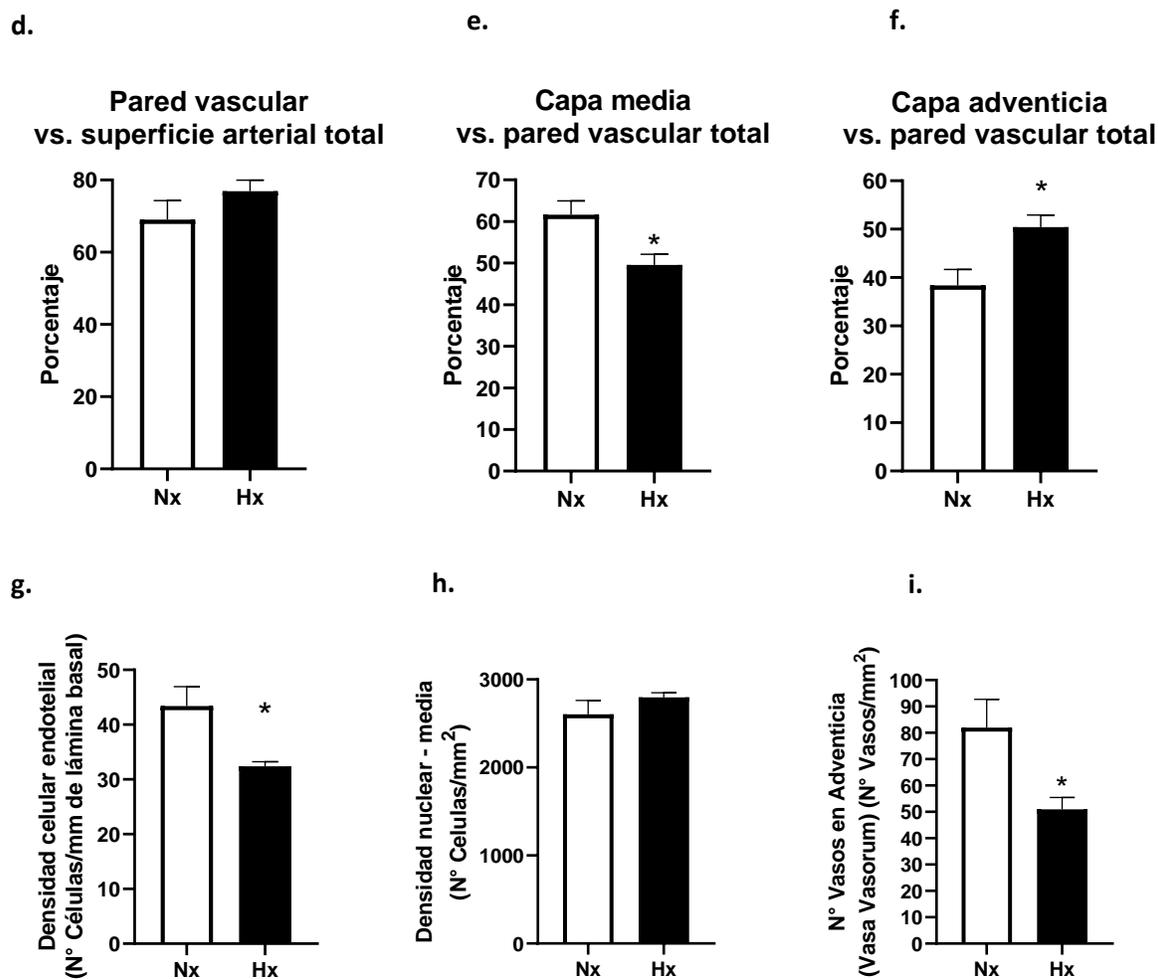


FIGURA 15. Características morfoestructurales de la arteria carótida en machos. Los histogramas muestran el área total (a), diámetro externo (b), diámetro interno o luminal (c), porcentaje que representa la pared vascular en relación a la arteria completa (d), porcentaje que representa la capa media en relación a la totalidad de la pared vascular (e), porcentaje que representa la capa adventicia en relación a la pared vascular en su totalidad (f), densidad celular endotelial (g), densidad nuclear de la capa media (h), densidad vascular en la capa adventicia o *vasa vasorum* (i), de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 5 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 5 animales, símbolos-barras negras). Sólo se utilizó la prueba de Mann-Whitney para el caso (c), mientras que para el resto de los datos se utilizó t-test. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

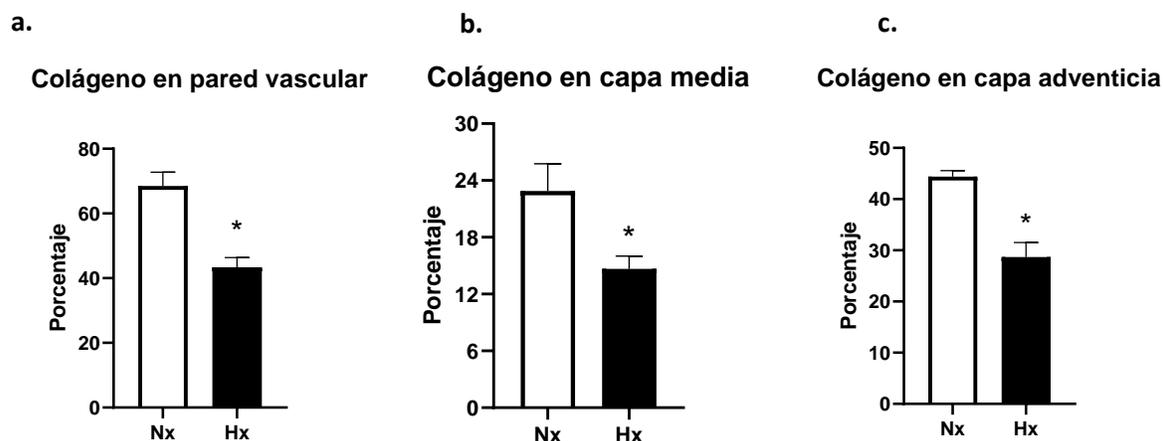
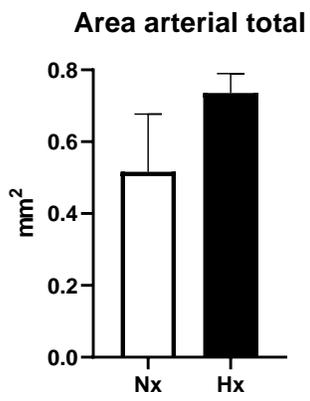


FIGURA 16. Características morfoestructurales relacionadas con la composición de colágeno de la arteria carótida en machos. Los histogramas muestran: el porcentaje de colágeno en la pared vascular arterial total (a), el porcentaje de colágeno de colágeno en la capa media (b) y el porcentaje de colágeno en la capa adventicia (c) de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 5 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 4 animales, símbolos-barras negras). Para todos los datos se utilizó t-test como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

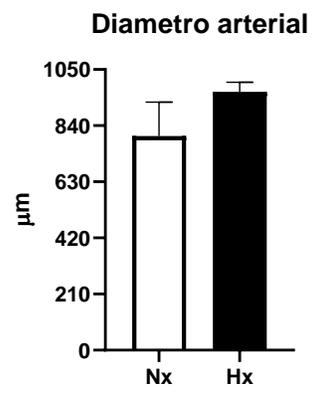
5.c. Características morfoestructurales de la arteria carótida en hembras

El grupo de arterias carótidas de las hembras hipóxicas no presentaron diferencias significativas en su tamaño, expresado como área arterial total y diámetro externo ni tampoco hubo cambios significativos en diámetro luminal (fig. 17 a, b y c). En cuanto a la pared vascular, tampoco se encontraron diferencias significativas en su proporción respecto al área arterial total estudiada ni en la propia composición de la pared en cuanto a la capa media y adventicia (fig. 17 d, e y f). No hubo diferencias significativas en la densidad endotelial y en el *vasa vasorum* (fig. 17 g e i), sin embargo, el grupo hipóxico presentó un aumento significativo de las células musculares lisas en la capa media respecto al grupo control (Fig. 17 h). Adicionalmente, la capa media de la arteria hipóxica presenta mayor densidad nuclear respecto a la arteria control (Fig. 17h). En cuanto al colágeno, no se encontró diferencia significativa en la totalidad de la pared vascular (fig. 18 a), sin embargo, se evidenció una disminución significativa en la capa adventicia de éste, sin acompañarse de un aumento significativo en la capa media (fig. 18 b y c).

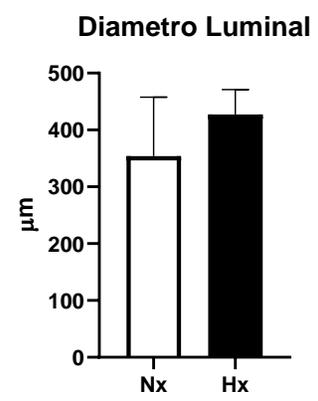
a.



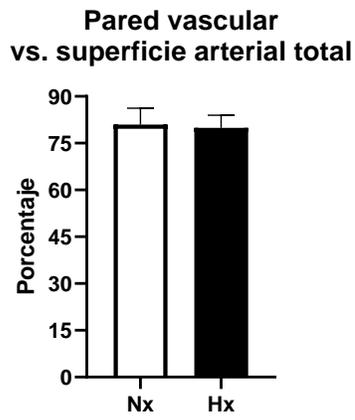
b.



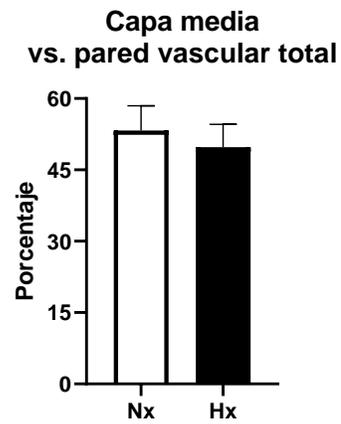
c.



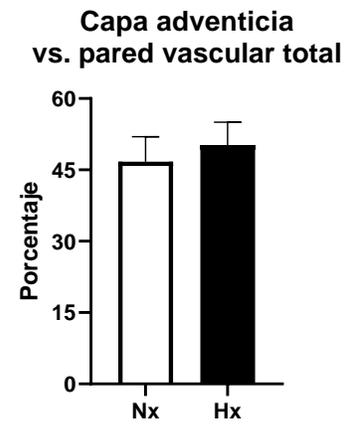
d.



e.



f.



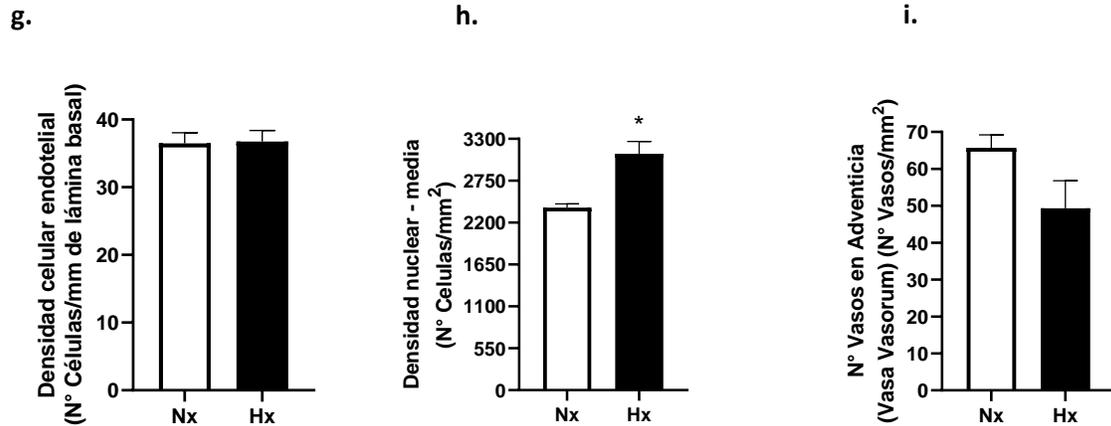


FIGURA 17. Características morfoestructurales de la arteria carótida en hembras. Los histogramas muestran el área total (a), diámetro externo (b), diámetro interno o luminal (c), porcentaje que representa la pared vascular en relación a la arteria completa (d), porcentaje que representa la capa media en relación a la totalidad de la pared vascular (e), porcentaje que representa la capa adventicia en relación a la pared vascular en su totalidad (f), densidad celular endotelial (g), densidad nuclear de la capa media (h), densidad vascular en la capa adventicia o *vasa vasorum* (i), de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 2 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 3 animales, símbolos-barras negras). Para todos los datos se utilizó t-test. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

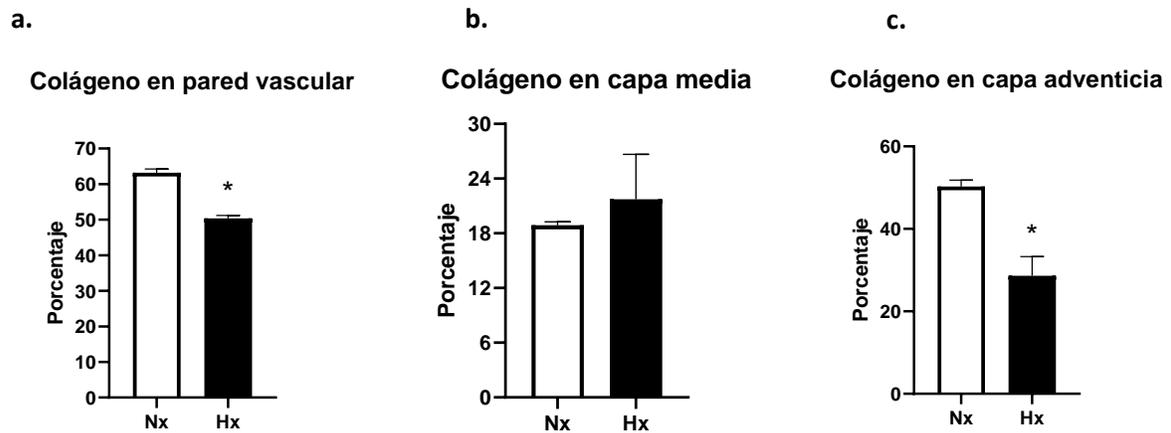


FIGURA 18. Características morfoestructurales relacionadas con la composición de colágeno de la arteria carótida en hembras. Los histogramas muestran: el porcentaje de colágeno en la pared vascular arterial total (a), el porcentaje de colágeno de colágeno en la capa media (b) y el porcentaje de colágeno en la capa adventicia (c) de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 2 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 3 animales, símbolos-barras negras). Para todos los datos se utilizó t-test como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

6.a. Características morfoestructurales de la arteria femoral

Las arterias femorales no difieren entre grupos, de forma significativa, en cuanto a área arterial, diámetro externo y luminal (fig. 19 a, b y c). Tampoco presentan diferencias en la proporción que abarca la pared vascular respecto a la totalidad de la arteria ni tampoco al analizar la proporción de sus capas (fig. 19 d, e y f). Sin embargo, las arterias del grupo hipóxico tienen, de forma significativa, una mayor densidad celular endotelial, así como también, una mayor cantidad de vasos en la capa adventicia (fig. 19 g e i). Respecto a la capa media, no hubo diferencias significativas en cuanto a la cantidad de células musculares lisas (fig. 19 h). Adicionalmente, las arterias hipóxicas presentan porcentualmente menor colágeno respecto al control, concentrándose esa disminución en la capa media de forma significativa (Fig. 20a, 20b). Los grupos estudiados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la proporción de colágeno de la pared vascular (fig. 20 a, b y c).

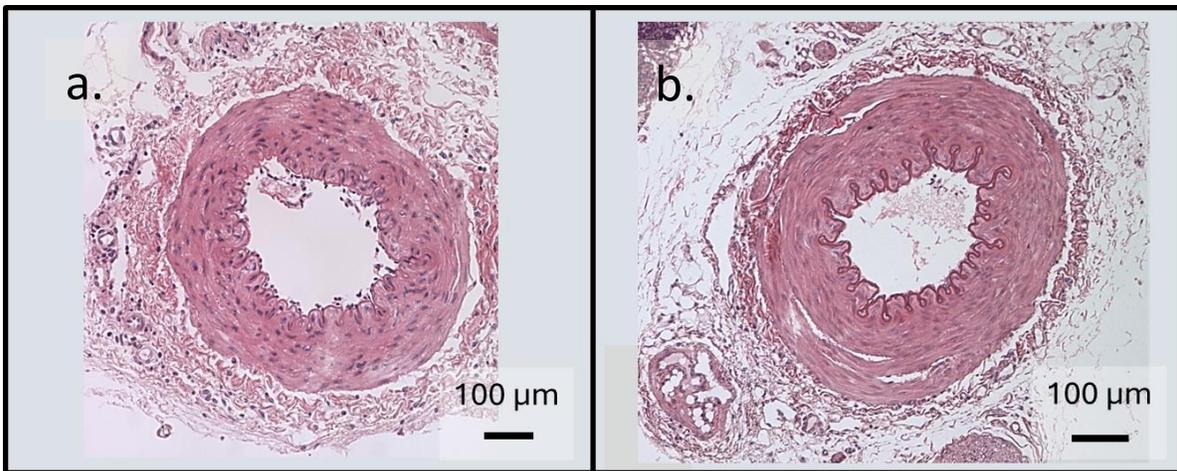
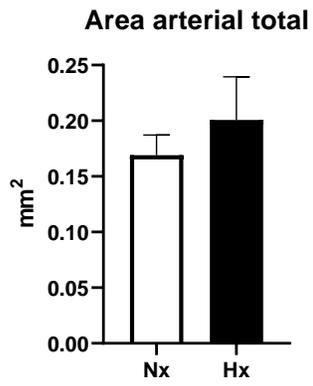
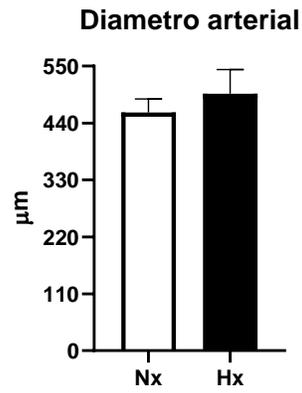


Imagen 6. Arteria femoral bajo tinción de Hematoxilina Eosina. Microfotografías representativas de capa media de arterias femorales (40x). a. Arteria de macho normóxico. b. Arteria de macho hipóxico. Para cada imagen, en la esquina inferior derecha se detalla la escala.

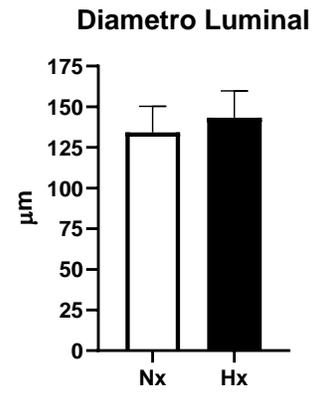
a.



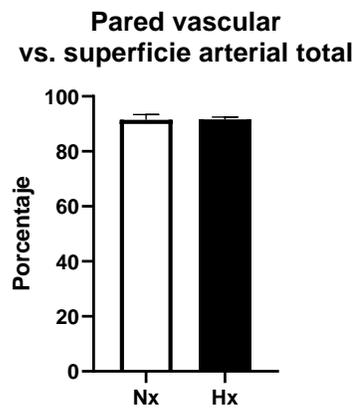
b.



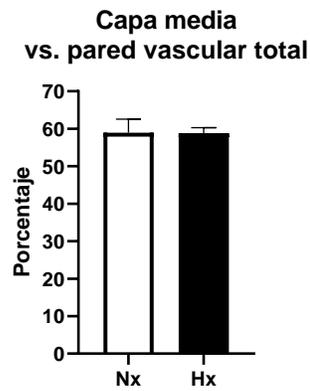
c.



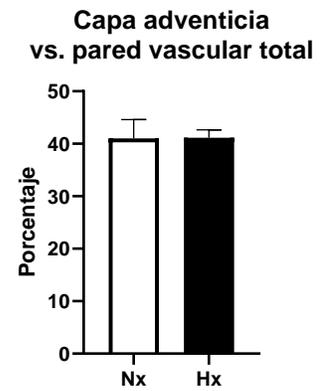
d.



e.



f.



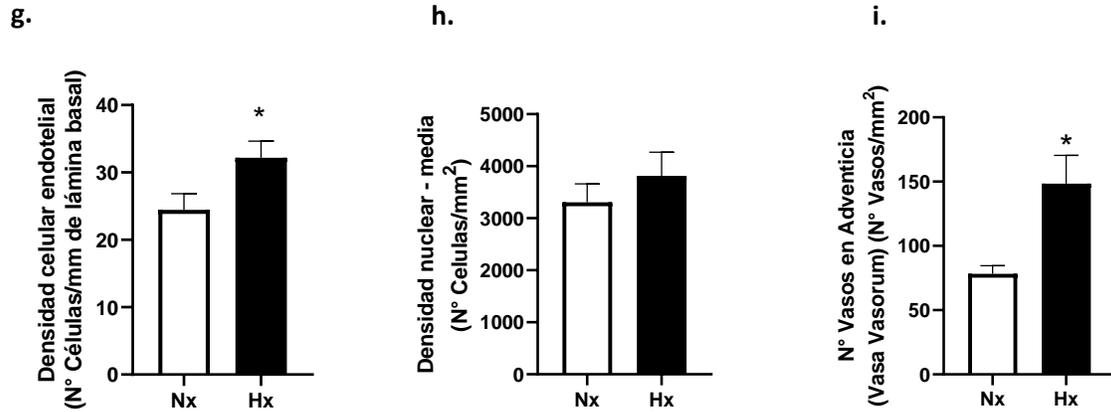


FIGURA 19. Características morfoestructurales de la arteria femoral. Los histogramas muestran el área total (a), diámetro externo (b), diámetro interno o luminal (c), porcentaje que representa la pared vascular en relación a la arteria completa (d), porcentaje que representa la capa media en relación a la totalidad de la pared vascular (e), porcentaje que representa la capa adventicia en relación a la pared vascular en su totalidad (f), densidad celular endotelial (g), densidad nuclear de la capa media (h), densidad vascular en la capa adventicia o *vasa vasorum* (i), de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 6 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 6 animales, símbolos-barras negras). Para (a) y (h) se utilizó la prueba estadística de Mann-Whitney, mientras que para todo el resto de los datos se utilizó t-test. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

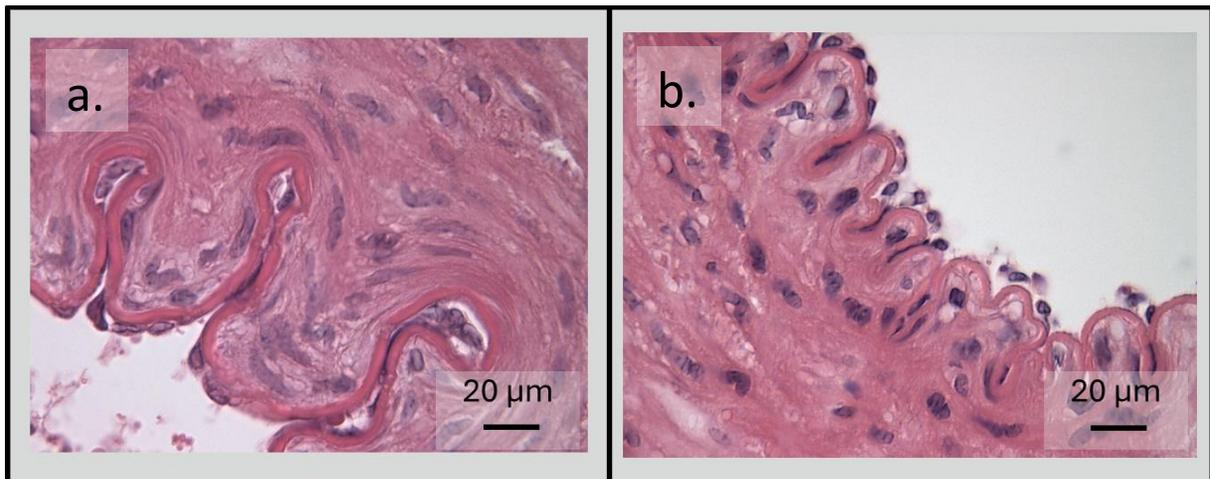


Imagen 7. Endotelio de arterias femorales bajo tinción de Hematoxilina Eosina. Microfotografías representativas de endotelio de arterias femorales (100x) a. Endotelio de arteria normóxica. b. Endotelio de arteria hipóxica. Para cada imagen, en la esquina inferior derecha se detalla la escala.

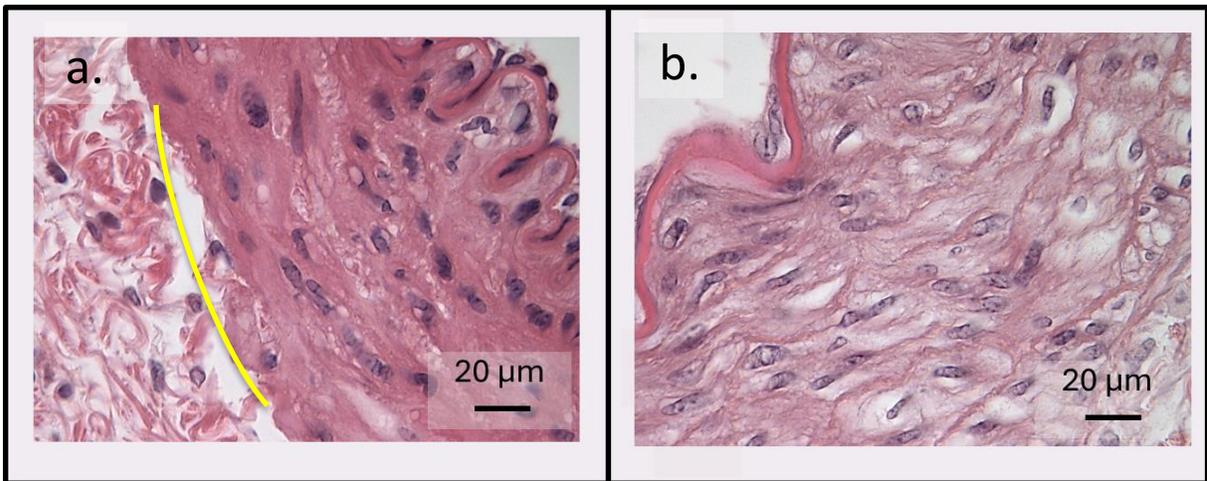


Imagen 8. Capa media de arterias femorales bajo tinción de Hematoxilina Eosina. Microfotografías representativas de capa media de arterias carótidas (100x). a. Capa media de arteria normóxica. Obsérvese la transición entre la capa media y la adventicia (línea amarilla). b. Capa media de arteria hipóxica. Para cada imagen, en la esquina inferior derecha se detalla la escala.

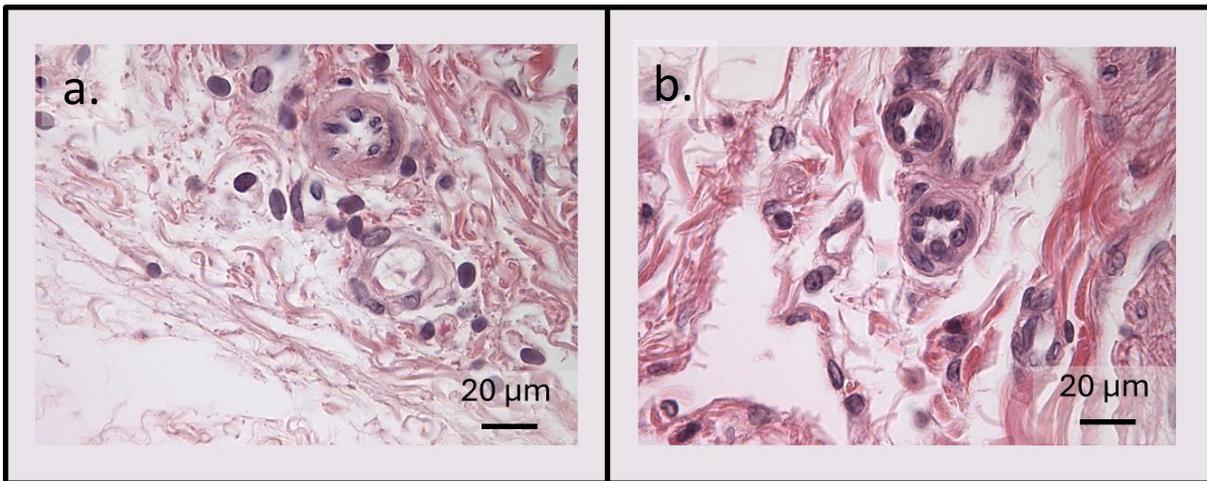


Imagen 9. Capa adventicia de arterias femorales bajo tinción de Hematoxilina Eosina. Microfotografías representativas de capa adventicia de arterias femorales (100x). a. *vasa vasorum* Arteria normóxica. b. *vasa vasorum* Arteria hipóxica. Para cada imagen, en la esquina inferior izquierda se detalla la escala.

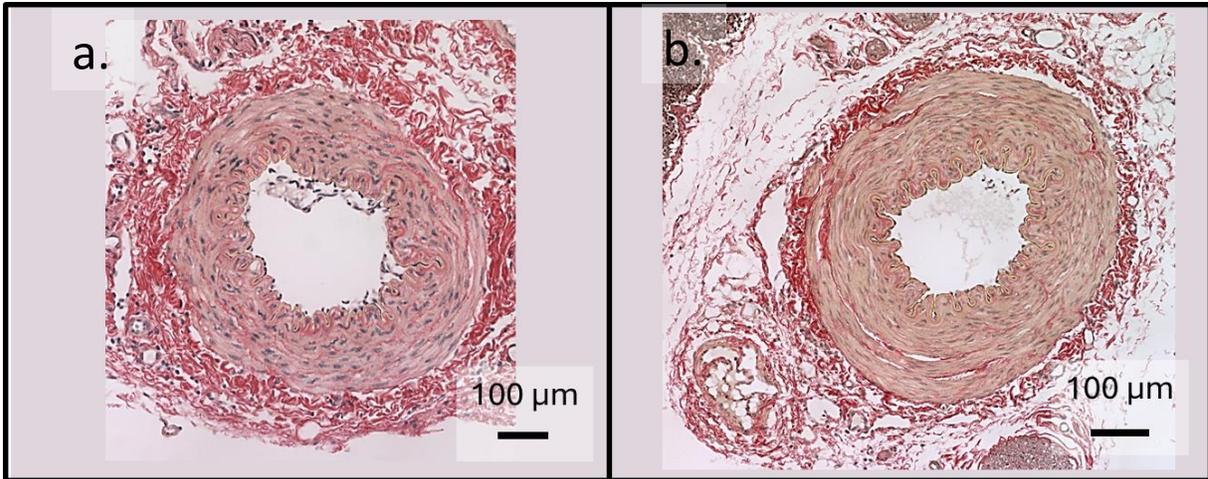


Imagen 10. Arteria femoral bajo tinción de Van Gieson. Las mismas arterias representativas mostradas en imagen 6 (40x). a. Arteria de macho normóxico. b. Arteria de macho hipóxico. Para cada imagen, en la esquina inferior derecha se detalla la escala.

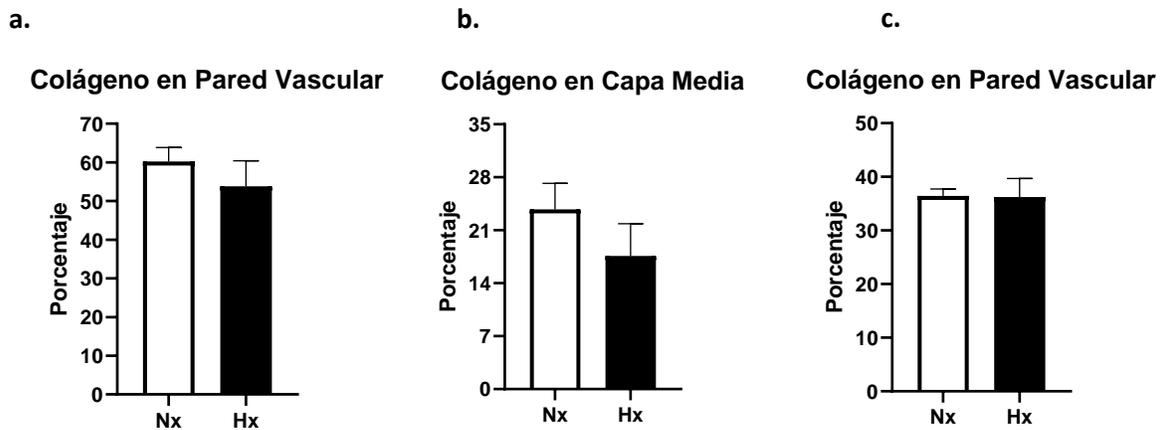
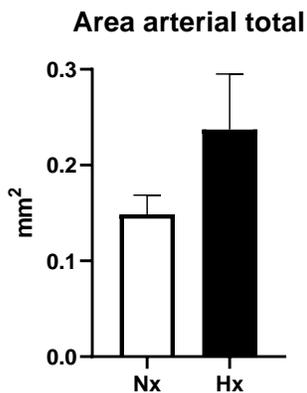


FIGURA 20. Características morfoestructurales relacionadas con la composición de colágeno de la arteria femoral. Los histogramas muestran: el porcentaje de colágeno en la pared vascular arterial total (a), el porcentaje de colágeno de colágeno en la capa media (b) y el porcentaje de colágeno en la capa adventicia (c) de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 4 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 5 animales, símbolos-barras negras). Para todos los datos se utilizó t-test como prueba estadística. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

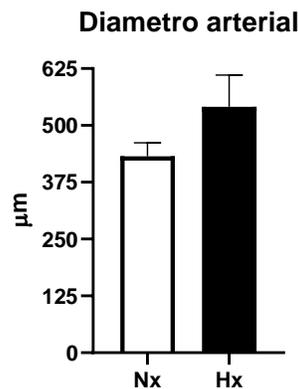
6.b. Características morfoestructurales de la arteria femoral en machos

Las arterias femorales de machos no presentan diferencias significativas en cuanto al área arterial, diámetro externo y diámetro luminal (fig. 21 a, b y c). Tampoco existieron diferencias significativas en la proporción de la pared vascular en relación con el área arterial total y en las capas que la componen (fig. d, e y f). El grupo hipóxico tampoco presentó diferencias significativas en cuanto a la densidad endotelial en la capa íntima ni tampoco en la densidad celular de la capa media (fig. 21 g y h). Adicionalmente, se observó un mayor número, de carácter significativo, en el grupo hipóxico en la cantidad de vasos en la capa adventicia (*vasa vasorum*) (fig. 21 i). En cuanto a la proporción de colágeno en la pared vascular, el grupo hipóxico mostró un porcentaje menor, de carácter significativo (fig. 22 a). Al analizar la pared vascular por las capas que la componen, se observó que sólo la capa media presenta un menor porcentaje, de carácter significativo, mientras que la capa adventicia no sufrió cambios significativos (fig. 22 b y c).

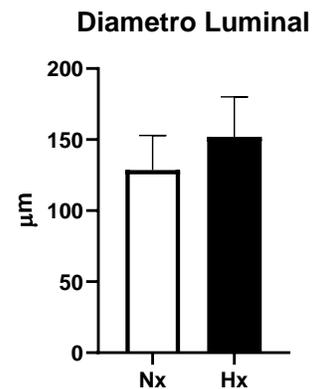
a.



b.



c.



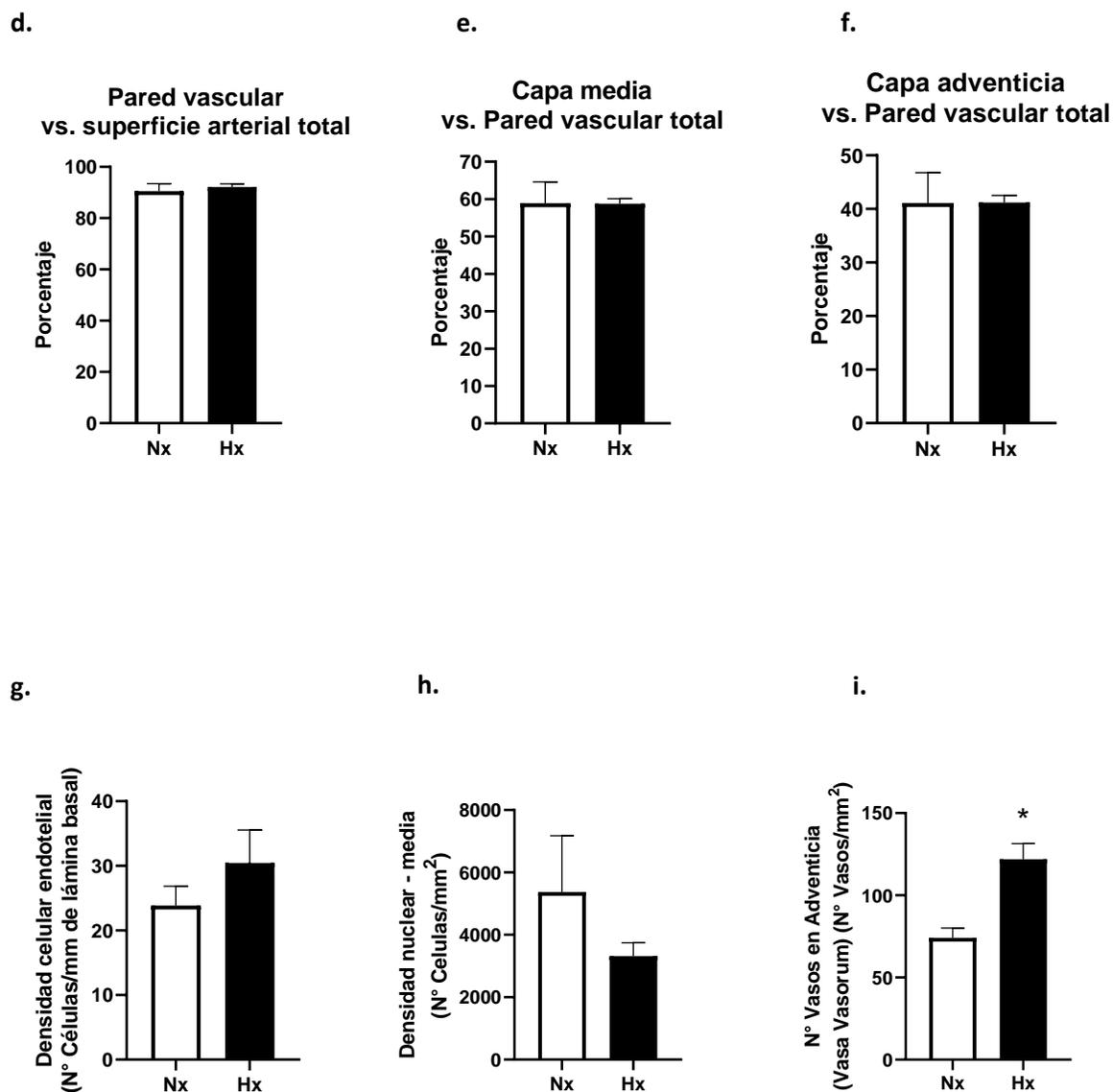


FIGURA 21. Características morfoestructurales de la arteria femoral en machos. Los histogramas muestran el área total (a), diámetro externo (b), diámetro interno o luminal (c), porcentaje que representa la pared vascular en relación a la arteria completa (d), porcentaje que representa la capa media en relación a la totalidad de la pared vascular (e), porcentaje que representa la capa adventicia en relación a la pared vascular en su totalidad (f), densidad celular endotelial (g), densidad nuclear de la capa media (h), densidad vascular en la capa adventicia o *vasa vasorum* (i), de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 4 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 3 animales, símbolos-barras negras). Para (h) se utilizó la prueba estadística de Mann-Whitney, mientras que para todo el resto de los datos se utilizó t-test. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

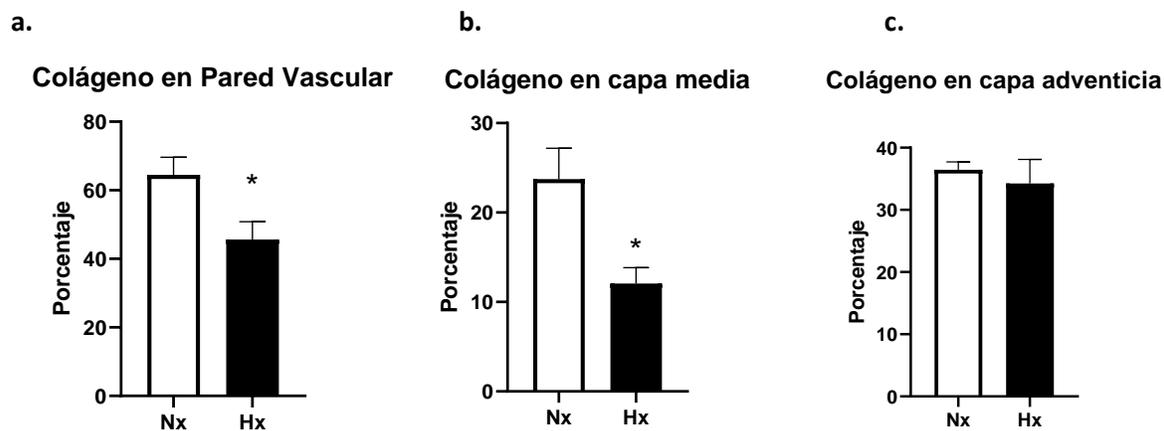
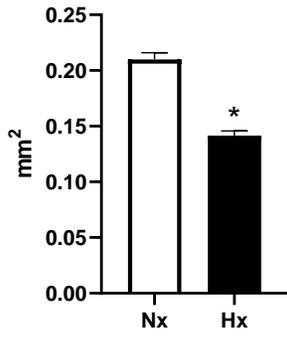


FIGURA 22. Características morfoestructurales relacionadas con la composición de colágeno de la arteria femoral en machos. Los histogramas muestran: el porcentaje de colágeno en la pared vascular arterial total (a), el porcentaje de colágeno de colágeno en la capa media (b) y el porcentaje de colágeno en la capa adventicia (c) de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 2 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 3 animales, símbolos-barras negras). Para (a) se utilizó la prueba estadística de Mann-Whitney, mientras que para el resto de los datos se utilizó t-test. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

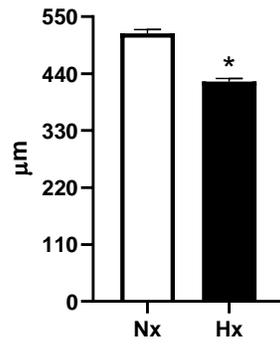
6.c. Características morfoestructurales de la arteria femoral en hembras

Las arterias femorales de las hembras hipóxicas presentaron un tamaño menor, de forma significativa, expresado como área arterial total y como diámetro externo arterial (fig. 23 a y b). El tamaño luminal no mostró diferencias significativas (fig. 23 c). El grupo hipóxico de hembras estudiadas mostró un aumento significativo de la densidad celular endotelial, de las células musculares lisas en la capa media y en los vasos de la capa adventicia (fig. 23 g, h e i). Respecto a la proporción de colágeno presente en la pared vascular, no existió diferencia significativa al comparar la pared vascular en su totalidad y sus capas (fig. 24 a, b y c).

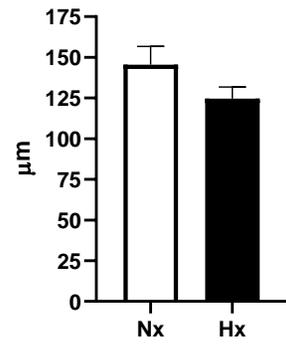
a. **Area arterial total**



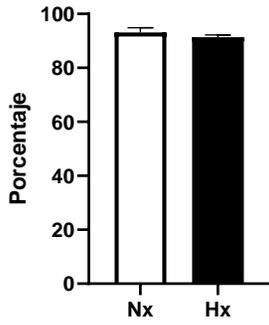
b. **Diametro arterial**



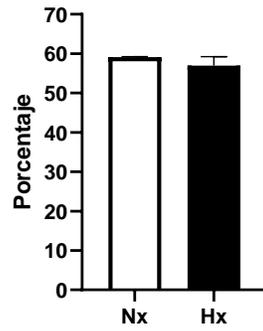
c. **Diametro Luminal**



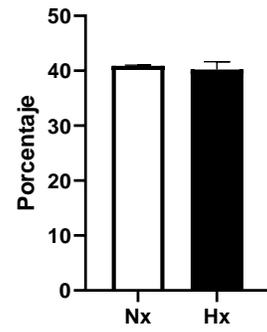
d. **Pared vascular vs. superficie arterial total**



e. **Capa media vs. pared vascular total**



f. **Capa adventicia vs. pared vascular total**



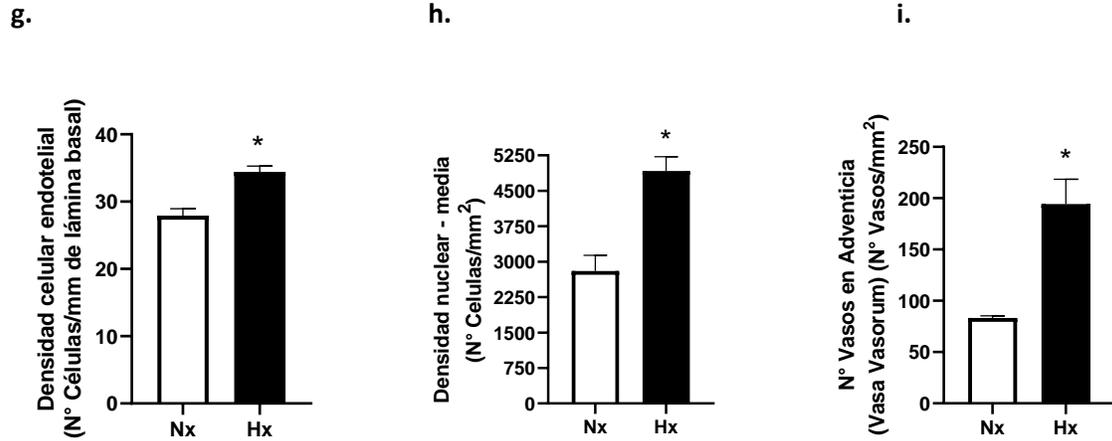


FIGURA 23. Características morfoestructurales de la arteria femoral en hembras. Los histogramas muestran el área total (a), diámetro externo (b), diámetro interno o luminal (c), porcentaje que representa la pared vascular en relación a la arteria completa (d), porcentaje que representa la capa media en relación a la totalidad de la pared vascular (e), porcentaje que representa la capa adventicia en relación a la pared vascular en su totalidad (f), densidad celular endotelial (g), densidad nuclear de la capa media (h), densidad vascular en la capa adventicia o *vasa vasorum* (i), de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 2 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 3 animales, símbolos-barras negras). Para todos los datos se utilizó t-test. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

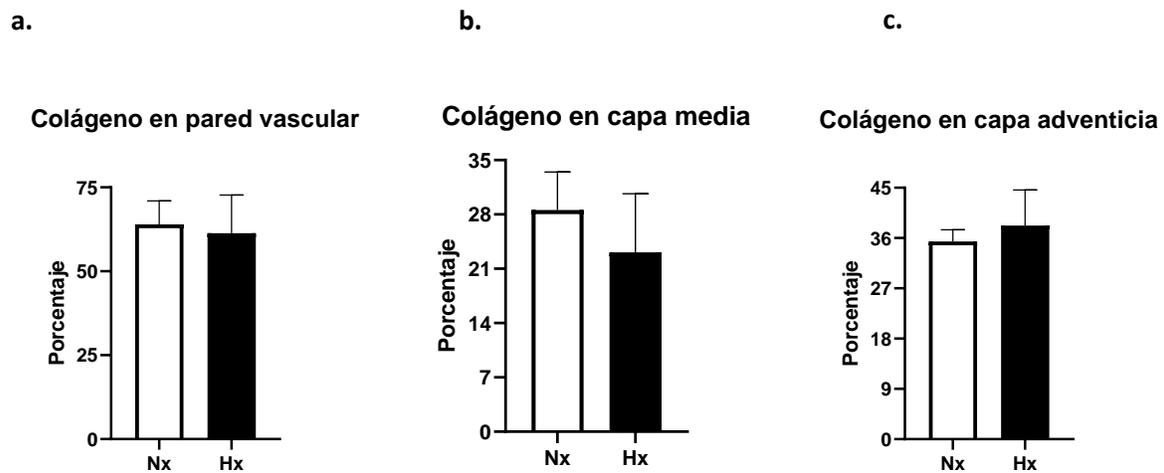


FIGURA 24. Características morfoestructurales relacionadas con la composición de colágeno de la arteria femoral en hembras. Los histogramas muestran: el porcentaje de colágeno en la pared vascular arterial total (a), el porcentaje de colágeno de colágeno en la capa media (b) y el porcentaje de colágeno en la capa adventicia (c) de cobayos adultos. Los grupos corresponden a animales gestados en normoxia (Nx, vasos de 2 animales, símbolos-barras blancas) y en hipoxia (Hx, vasos de 2 animales, símbolos-barras negras). Para todos los datos se utilizó t-test. Diferencia significativa ($p \leq 0,05$): * vs Nx.

DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue determinar si la hipoxia hipobárica crónica durante la segunda mitad de la gestación produce cambios en la función y estructura vascular periférica en la etapa adulta. En este sentido, los individuos del modelo estudiado permitieron evidenciar cambios funcionales y estructurales vasculares en la vida adulta, considerando que el estímulo hipóxico se aplicó cuando la organogénesis y diferenciación del sistema cardiovascular ya estaban establecidos (Morrison y cols., 2018). Los resultados iniciales sin separación por sexo de los individuos estudiados permitieron determinar que la arteria carótida presenta más alteraciones por hipoxia respecto a la femoral en cuanto a función y estructura. Sin embargo, se hizo necesario separar por sexo, dado que existirían factores que podrían condicionar cambios específicos según género. Los individuos en su totalidad se estudiaron el día de vida 75, equivalente a una edad de adulto joven. Esta queda definida por la posibilidad de poder concebir y desarrollar crías de forma normal (edad fértil) (Trillmich y cols., 2006). Tanto en humanos como en cobayos, la pubertad marca este período que consta de una serie de cascadas hormonales que llevan a la maduración biológica que incluye los vasos. Se liberan hormonas suprarrenales del estrés, se produce un crecimiento ponderal que por el desarrollo de órganos y estructura musculoesquelética bajo la influencia de las gonadotrofinas hipofisarias que desencadenan cambios gonadales con la consecuente liberación hormonal y el cambio específico según sexo. Dado que la maduración depende además de las interacciones sociales de las crías y que las hormonas asociadas al estrés se relacionan con procesos de remodelación o cambios en la función vascular, las crías se mantuvieron juntas hasta el día 28 para asegurar la socialización y controlar el estrés tal cual como recomendó Trillmich y cols., el año 2005. Una vez que son separados, las condiciones de bioterio estándar se mantienen, lo cual mantiene controlada la posibilidad de que otros estímulos (ambientales) afecten el desarrollo del individuo hasta la edad en la cual se realiza la eutanasia. Esto controla los posibles factores que impacten sobre las arterias de interés. Por lo tanto, desde la concepción a la eutanasia, las condiciones estándar del bioterio, protocolos de cuidado animal y de eutanasia contribuyeron a limitar variables desconcertantes asociados al estrés, intermitencia y cualquier otro estímulo que pudiese condicionar la respuesta de

los individuos en estudio. Los antecedentes que describen los cambios en el adulto posterior a una hipoxia fetal son resumidos en un artículo de Giusanni (2021), tras una revisión sistemática en la que se incluían múltiples especies, incluyó a un estudio hecho en cobayos que fueron sometidos restricción de flujo sanguíneo de la arteria uterina, con lo cual indirectamente se condicionó bajo hipoxia al feto (Herrera y cols., 2016). Se observó que en los individuos adultos existió un mayor índice de resistencia periférica y signos de remodelación vascular en las arterias femorales, junto con un deterioro de la función endotelial en las arterias carótidas y femorales. (Krause y cols., 2019). El resto de los antecedentes se concentran en la edad neonatal. Así pues, los neonatos con bajo peso, secundario a restricción de crecimiento uterino o bajo hipoxia, al nacer mostraron una vasodilatación dependiente de endotelio reducida (Martin y cols., 2000), situación que también se observó en las arterias placentarias y umbilicales (Krause y cols., 2013; Schneider y cols., 2015) y que además se extienden a la aorta, dado que se encontró una remodelación, así como a un aumento de la rigidez aórtica en la infancia (Bradley y cols., 2010). Adicionalmente, existió una relajación dependiente de la eNOS alterada en las arterias sistémicas y umbilicales (Herrera y cols., 2017), que se produce en paralelo con una remodelación vascular y una consolidación de un estado pro-vasoconstrictor en la aorta y las arterias femorales, pero no en la arteria carótida (Cañas y cols., 2017). Estos datos son el precedente para interpretar los resultados de este trabajo, ya que se desconocía si estos cambios son perpetuados desde temprana edad, si es que empeoran con el tiempo o si es que el individuo es capaz de normalizar la función y estructura con avance del tiempo. Queda, por lo tanto, como desafío, contrastar los datos con un estudio que compare la población recién nacida y con una edad posterior al grupo presentado en este trabajo. Este trabajo permitió demostrar que la hipoxia hipobárica crónica modificó la estructura de la arteria carótida generando cambios en la pared vascular de la capa media y de la adventicia. La disminución de la capa media ocurrió a pesar de un aumento del número núcleos que se extrapola a un aumento de células musculares lisas, considerando que cada célula sólo posee un núcleo (Gao, 2016). Esto cobra relevancia en cuanto a que es necesario analizar desde el punto de vista de la biología celular el grado de diferenciación celular o si es que han retornado a una fase

proliferativa, comprometiendo así la cuantía de la maquinaria contráctil, lo cual tendría un impacto funcional. La disminución de la capa media se acompañó con un aumento de la capa adventicia, lo cual preservó el espesor de la pared vascular. La disminución del colágeno en ambas capas y la disminución del *vasa vasorum* en la adventicia plantea la necesidad de identificar otros componentes como elastina, tejido graso, fibroblastos en diferentes grados de diferenciación (Stenmark y cols., 2006) que pudiesen haber aumentado a costa de la disminución de la capa media. Respecto al *vasa vasorum*, se ha establecido que tiene relevancia desde el punto de vista patológico, pues se ha visto asociado, cuando se encuentra aumentado, con mayor presencia de células inflamatorias, factores de crecimiento y células madre, hacia las capas más internas (Hu y cols., 2006; Moulton y cols., 2003). La disminución en este caso podría ser un mecanismo adaptativo protector en las arterias hipóxicas y además podría tener algún rol en la disminución en el menor desarrollo de la capa media y con la menor densidad endotelial. Los datos derivados del dimorfismo demostraron que existe un desarrollo diferencial asociado al género. Así, el grupo de machos replica el comportamiento global en la cual existe una preservación luminal y de la pared vascular, cambiando la proporción ocupada por cada una de las capas, aumentando la capa adventicia a costa de una disminución de la capa media sin compensación en la densidad celular. El crecimiento se acompaña además de una disminución del *vasa vasorum* con disminución de la densidad endotelial. Estructuralmente también se replica la disminución de colágeno en el grupo hipóxico en toda la arteria. Las hembras, en cambio, preservan no sólo el tamaño arterial, sino que además definen el comportamiento global de la capa media en la cual aumenta de forma significativa la cantidad de células musculares lisas. Ocurrió además que la pérdida de colágeno se da de forma significativa en la capa adventicia, sin cambio en el *vasa vasorum*. De estos hechos se desprende de que probablemente la estructura vascular de la propia arteria, al estar preservada, podría contribuir al aumento de la densidad celular de la capa media y con la preservación del endotelio.

Los cambios morfológicos, como era de esperar, se relacionaron con cambios en la función. La arteria carótida del grupo hipóxico presentó una disminución significativa de la capacidad contráctil, comportamiento que es encontrado además en el grupo de

los machos, pero no en las hembras. El grupo de hembras se caracterizó por que la carótida presentó una mayor densidad de células musculares lisas y una preservación del *vasa vasorum*, lo cual podría suponer un mecanismo de protección o preservación para este género. Aun así, pudiese entenderse que la menor capacidad contráctil, relacionada con una menor densidad celular muscular podría también guardar relación con un fenotipo compensatorio, considerando que la arteria carótida, según su función de preservación de función crítica cerebral, debiese estar teóricamente en un estado pro-vasodilatador (Miller y cols., 2016). El cambio macroestructural no sería el completo responsable de la modificación de la capacidad contráctil máxima, que es analizada con KCl (Herrera y cols., 2010). La adición de KCl resulta en la despolarización y posterior contracción del músculo liso (Ferrara & Davis-Smyth, 1999). La disfunción visualizada en machos y en la arteria carótida de forma global en el estudio, podría obedecer a un cambio en la expresión y/o funcionamiento de los canales de calcio voltaje dependientes, que se relacionarían directamente con el inicio de la contracción y que serían los principales responsables del inicio del cambio de potencial (Gao y cols., 2016). Como el potasio induciría un cambio de potencial que afectaría el medio externo, no sólo se vería afectada la capacidad contráctil, sino que la predisposición a una respuesta contráctil inducida por ligando. De forma global, se reconoce que el músculo liso vascular posee al menos 4 tipos de canales de potasio y dos de calcio involucrados en la vasoconstricción que podrían estar implicados en la capacidad y respuesta contráctil, además de ser afectados por la hipoxia por modificación del epigenoma: Los canales de K^+ son el K_{ir} o rectificador anómalo, el K_{ATP} o sensible a ATP, el $K_{Ca^{+2}}$ o activado por calcio y el K_{dr} o rectificador tardío, y los canales de calcio tipo T y L (Pintérová y cols., 2011; Gao, 2017). Por lo tanto, la modificación en cuanto a la vasoconstricción, dada la existencia de múltiples canales, puede ser de origen multifactorial y no únicamente debida a un cambio de voltaje inducido por KCl (Gao, 2017). Existen mecanismos que involucran a receptores de la fosfolipasa C (PLC) que generan una respuesta contráctil mediada por la liberación de Ca^{+2} a través el receptor de inositol 1,4,5-trifosfato (IP_3) (IP_3R) desde el retículo sarcoplásmico (Thorneloe y Nelson 2005). Al igual que para individuos neonatos, existe la teoría de que la vasoconstricción se ve modificada por un desbalance de

canales iónicos tanto rectificadores como activados por voltaje y entre los canales de calcio que permitirían un ingreso de este ion desde el medio extracelular al intracelular, además de la salida de este desde el retículo endoplasmático liso (Stenmark y cols., 2006; Mauban y cols. 2005). El endotelio también estaría involucrado en la vasoconstricción, ya sea por una disminución de agentes vasodilatadores o un aumento de vasoconstrictores. Existe una actividad dependiente de endotelina-1, de óxido nítrico y de prostaciclina (PGI₂) que se vería involucrado en la mantención de un tono, ya sea pro-vasoconstrictor o pro-vasodilatador y que podría ser modificado por la hipoxia (Gao, 2017). Se podría hipotetizar, por tanto, que, en el caso de los machos, en el cual existe una disminución de una densidad endotelial, podría existir un fenómeno asociado con esta capa que determine una capacidad contráctil disminuida y una respuesta contráctil a serotonina disminuida como lo observado en este grupo de estudio. En el grupo de hembras, en la cual la capacidad contráctil no se vio afectada, podría ser explicada por el efecto de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular, en el cual induce proliferación de músculo liso vascular y el aumento de la producción de NO (Cooke y cols., 2017), lo cual mantendría no solo la regulación, sino que la maquinaria contráctil. Los estrógenos producen efectos en los vasos sanguíneos mediante mecanismos genómicos y no genómicos y estos efectos están mediados a través de receptores de estrógenos (Liu y cols., 2005), que se expresan en las células del músculo liso vascular. Los estrógenos inhiben la contracción de las células musculares lisas por diferentes mecanismos: inhiben canales de calcio (lo que disminuye el calcio intracelular) y activan canales de potasio (ambos presentes en la célula muscular lisa), inhiben la proteína quinasa C e inhiben la vía de señalización Rho/Rho-quinasa (Reslan & Khalil, 2012; Smiley & Khalil, 2009). También disminuyen la síntesis de colágeno (Cooke y cols., 2017) como lo observado en este estudio. Estos datos previos orientan a que los estrógenos juegan un rol fundamental en el desarrollo macroestructural y en la función vascular. Particularmente, en el grupo de machos hipóxicos ocurrió una disminución de la respuesta contráctil evocada por serotonina (5ht). Al respecto, se debe partir de la base de que los receptores de serotonina a nivel vascular se encuentran en el endotelio (tipo 5-HT_{2B} en arterias como la carótida), los cuales inducen vasodilatación mediada por NO y también en las células musculares

lisas (tipo 5-HT_{2A} y 5-HT₇) los cuales inducen vasoconstricción (Ayme-Dietrich y cols., 2017). Los tres tipos de receptores corresponden a aquellos asociados a proteína G, siendo los tipo 5-HT₂ acoplado a proteína G_q que media su respuesta a través de la liberación de IP₃ y DAG, mientras que el 5-HT₇ media sus efectos a través del incremento de AMPc a nivel intracelular (Nadeev y cols., 2014). La disminución de la respuesta contráctil sin cambios en la sensibilidad implicaría una respuesta disminuida por parte de la célula muscular lisa o bien una estimulación con predominancia de los receptores endoteliales que podrían mediar el predominio de un estado vasodilatador. Si existe un predominio del receptor tipo 5-HT₇ en la célula muscular lisa, existiría un aumento del AMPc que induciría la activación de PKA que limitaría la salida de Ca⁺² del retículo sarcoplásmico, con lo cual disminuiría la contracción muscular evocada. La hipoxia, por lo tanto, podría tener efectos además en el sitio y tipo de expresión de receptores de serotonina. Adicionalmente, se ha demostrado que la 5-HT ejerce su efecto proliferativo y migratorio a través de los receptores 5-HT₂ en las células musculares lisas (Machida y cols., 2013). El hecho que exista una menor densidad celular en la capa media podría implicar que el tipo de receptor relacionado por la proliferación se encuentra expresado a la baja al comparar con el grupo control, sin embargo, no sólo los canales inducen la proliferación. Existe un mecanismo dependiente de MAPK/ERK que se relaciona directamente con la proliferación y la remodelación. Se sabe que las condiciones hipóxicas se modifican los niveles plasmáticos de serotonina, la actividad del transportador de serotonina y la expresión de los receptores 5-HT_{1B} y 5-HT_{2B}. Estos parecen ser necesarios para la proliferación de células vasculares, que depende además de la proporción entre las especies reactivas de oxígeno y el óxido nítrico (Esteve y cols., 2007). Ito y cols., el año 2000 informaron de que la activación de los receptores 5-HT_{2A} aumenta la síntesis de interleukina-6 (IL-6) en las células musculares lisas humanas, al menos parcialmente, de forma dependiente de la PKC. La activación de la PKC que inhibe la translocación del factor nuclear-κB inducida por el TNF-α está implicada en los mecanismos. Por lo tanto, existe adicionalmente un componente inflamatorio-inmunológico que podría actuar como factor regulador no sólo de la función vascular, sino que del fenómeno de remodelación. A esto se suma el hecho de que la disminución del *vasa vasorum*

predominantemente en machos, se relacionaría además con una aparición de hipoxia temprana y el favorecimiento de un medio sometido a estrés oxidativo, lo cual modificaría completamente la función vascular (Esteve y cols., 2007). Como se mencionó anteriormente, la hipoxia podría modificar el estado pro-vasoconstrictor o pro-vasodilatador, por lo tanto, se esperaría que la vasodilatación como parte de la función vascular, también estuviese alterada. Los datos al respecto mostraron que, como efecto global no hubo diferencias significativas entre los grupos estudiados. Sin embargo, las diferencias aparecieron al analizar el dimorfismo. Así, por ejemplo, el primer cambio significativo es que la vasodilatación dependiente del endotelio en machos presenta una disminución de la sensibilidad. Este es un concepto que está definido por el número de receptores y la afinidad del fármaco por los receptores (Neubig y cols., 2003), por lo tanto, los cambios posibles se relacionan con estas variables. La metacolina (MetCh), utilizada para evaluar la vasodilatación dependiente de endotelio, es un fármaco agonista que actúa sobre los receptores de tipo muscarínicos M₃, subtipo predominante en los vasos, que se encuentran tanto en el endotelio como en el músculo liso del tejido vascular, siendo predominantes en el primero (Saternos y cols., 2018). Si está intacto produce vasodilatación, mientras que, si está dañado, la activación del receptor en el músculo liso induce vasoconstricción (Dauphin & Hamel, 1990; Harvey, 2012). Con la disminución de la densidad endotelial se hubiese esperado que aumentara la sensibilidad para mantener la función, sin embargo, esto no ocurre, por lo que debe existir otro mecanismo compensatorio para mantener la respuesta. Si los receptores muscarínicos fueran predominantes en las células musculares lisas por disminución en el endotelio, el vaso se encontraría en un estado pro-vasoconstrictor (Bény y cols., 2008), lo cual tendría relación con la menor capacidad y respuesta contráctil estudiada. Pese a que se ha descrito la presencia de receptores de tipo nicotínicos, de los cuales la acetilcolina es su principal agonista endógeno, tanto en el endotelio como en las células musculares lisas (Brüggmann y cols., 2002), estos quedarían fuera de rango de alcance de este estudio, dado que el agonista metacolina es altamente selectivo para los receptores muscarínicos (Nooney y cols., 1992). Aun así, podrían tener cierto grado de participación in vivo, dado que participan dentro de la señalización para la proliferación y migración celular orientada

a la formación de nuevos vasos (Carmeliet & Jain, 2000). Se suma a estos antecedentes que los monocitos participan en la arteriogénesis y en la formación del *vasa vasorum*. Arras y cols. en 1998, han demostrado que la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1) potencia la formación de colaterales en donde se han activado los mecanismos de señalización a través de receptores nicotínicos, por lo que estos receptores en presencia de monocitos podrían tener un rol no solo en el trofismo del vaso, sino que además en la proliferación vascular del mismo vaso (Arras y cols., 1998). En el caso de las hembras, destaca el hecho que no mostraron diferencias significativas en cuanto a la vasodilatación dependiente de endotelio. La densidad endotelial se encuentra sin diferencias, por lo que debería esperarse una preservación del mecanismo y de la regulación del tono vascular. Los datos mostraron que la vasodilatación inducida dependiente de endotelio se encuentra aumentada, y podría tener relación con el efecto de estrógenos circulantes. Los estrógenos producen vasodilatación dependiente del endotelio al aumentar el NO, la prostaciclina y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) y al disminuir la expresión de endotelina-1. (Smiley y cols., 2009; Cooke y cols., 2017) Adicionalmente aumentan la producción de NO y de prostaciclina al estimular la expresión de las enzimas eNOS y prostaciclina sintasa (IGP), respectivamente (Sobrino y cols., 2010), por lo que la circulación de estrógenos condicionaría una respuesta pro-vasodilatadora secundaria a múltiples mecanismos.

En la vasodilatación independiente del endotelio, los resultados de este trabajo mostraron que las arterias carótidas hipóxicas de machos fueron afectadas, pues presentan una menor respuesta vasodilatadora y además una menor sensibilidad al utilizar SNP. El sodio-nitroprusiato o SNP corresponde a un dador de NO, lo cual implica saltar el paso de producción de NO por parte del endotelio, pues la molécula se incorpora a la célula muscular lisa y luego se procesa en NO, con lo cual se activa el mecanismo intracelular de vasodilatación (Barnes & Liu, 1995). Dado que en macho existen diferencias significativas en el número de células y porcentaje ocupado por capa muscular o media, que es el blanco farmacológico del SNP, la disminución de la sensibilidad y de la respuesta a máxima a SNP vendría dada por una disminución en el número de células que se comportarían como efectores, pero además podría darse

por una disminución de la expresión o actividad de las moléculas perteneciente a los mecanismos rio abajo gatillados una vez que el NO ha sido producido a partir del SNP, como por ejemplo la guanilato ciclasa soluble o incluso llegando a afectar el número o función de los canales SERCA involucrados en los cambios de concentración del calcio intracelular. Aunque se evalúen de forma separada los mecanismos dependientes e independientes del endotelio, in vivo los mecanismos coexisten y forman parte del sistema de regulación del tono vascular (Lincoln y cols., 1994).

Respecto a la arteria femoral, su función y morfología se debe analizar considerando su comportamiento de arteria periférica sistémica, que en etapas tempranas del desarrollo fetal presenta una condición pro-vasoconstrictora como mecanismo de defensa frente a una injuria ambiental como hipoxia para la redistribución del flujo sanguíneo hacia órganos como cerebro y corazón (Morrison y cols., 2018). Este trabajo permitió mostrar que las arterias femorales hipóxicas presentan cambios principalmente a nivel microestructural, específicamente, a nivel del endotelio y de los vasos que forman parte de la capa adventicia. El dimorfismo contribuye con el hecho de que los machos presentan un cambio significativo en la composición porcentual de colágeno en la capa media, mientras que las hembras presentan un adelgazamiento de la pared vascular sumado a mayor densidad endotelial. Para ambos géneros, existió el factor común de una mayor densidad del *vasa vasorum*. La observación realizada en este trabajo de miles de imágenes, dan luces inmediatas del complemento que se debe hacer a este estudio para explicar cambios morfológicos y funcionales. Las arterias femorales están caracterizadas por una capa adventicia que extiende su alcance y continuidad hasta el tejido linfoide. Existe una estrecha relación con linfonodos y evidenció además un acúmulo importante de células que forman parte del sistema inmune como monocitos, además de fibroblastos, lo cual sugeriría que existen factores que se han documentado que podrían contribuir con cambios morfológicos y funcionales más allá de los que aquí se han planteado. Anteriormente se mencionó que el *vasa vasorum* juega un rol importante en el origen, desarrollo y progresión de las enfermedades cardiovasculares, en la angiogénesis y en la proliferación de las capas arteriales, al proporcionar el medio de conducción y migración de mediadores inflamatorio, factores de crecimiento y fibroblastos implicados en el proceso de

remodelación (Hu y cols., 2006). Para este grupo arterial, aunque la capa adventicia no se encontró aumentada, la mayor densidad del *vasa vasorum* indicaría que existen factores angiogénicos que son independientes de las hormonas sexuales, y que, dada la proximidad con otros tejidos, podría sufrir una regulación para el desarrollo estructural e incluso en su función dependiente del tejido circundante y la posibilidad de interacción con el sistema inmune de una forma más estrecha que en otros territorios (Moulton y cols., 2003). La adventicia se compone principalmente de matriz extracelular (MEC), un conjunto de colágenos, elastinas, glicoproteínas, glicosaminoglicanos y proteoglicanos. En el marco estructural proporcionado por la MEC, diversos tejidos como los *vasa vasorum*, vasos linfáticos y nervios, así como muchas células diferentes, como fibroblastos, células inmunitarias y células progenitoras vasculares circundan el tejido y participan del desarrollo estructural y de la función (Gao, 2017). El grupo celular más abundante es el fibroblasto. Estos desempeñan un papel central en la hemostasia de la MEC y son quienes reciben los estímulos que no solamente determinan la proliferación vascular de la propia capa, sino que además proporcionan los grupos celulares que migrarán hacia las capas más internas como la media e íntima (Stenmark y cols., 2013; Arpino y cols., 2015). Cuando se exponen a hipoxia, isquemia o fuerza mecánica, los fibroblastos pueden liberar una compleja mezcla de factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas y especies reactivas del oxígeno (ROS), lo que provoca una alteración del entorno de la MEC y profundos cambios en el tejido vascular, pudiendo llegar a impactar la función por cambio en el medio circundante (Stenmark y cols., 2013). La capa adventicia además tiene una estrecha relación con el tejido adiposo perivascular (TAPV). El TAPV puede secretar una amplia gama de moléculas bioactivas que influyen en la contractilidad vascular, la proliferación y el estado inflamatorio de los vasos sanguíneos (Gao, 2018).

Se ha demostrado que varios compuestos liberados por el TAPV causan vasodilatación como por ejemplo la adiponectina, H₂S, NO, angiotensina I-VII, éster metílico del ácido palmítico y prostaciclina, mientras que la estimulación eléctrica puede causar vasoconstricción a través de la angiotensina II liberada por el TAPV (Gao, 2017). El TAPV también puede afectar al estado inflamatorio mediante la

liberación de citocinas proinflamatorias como MCP-1, interleukina-8 e interleukina-6, así como moléculas antiinflamatorias como la adiponectina (Omar y cols., 2014).

Desde el punto de vista funcional la arteria femoral hipóxica, se encontró que, de forma global, la capacidad contráctil vio disminuida y la contribución de esta significancia viene dada por los machos, quienes replican el resultado al estudiar el grupo por género. En este caso, se podría hipotetizar que, dada la inexistencia de modificación en cuanto a la densidad celular de la capa media y la inexistencia de cambios en el grosor de la pared vascular, el mecanismo subyacente apuntaría en cambios a nivel de la respuesta evocada a través de canales relacionados con un cambio de potencial inducido por KCl o bien por la regulación del calcio intracelular y en los cuales se pueden ver implicado los mecanismos de ingreso de este ion desde el medio extracelular. Se suma además el hecho de que existe evidencia que los andrógenos como la testosterona modificaría la contractilidad vascular a través de un mecanismo dependiente de endotelio. Se genera un estado pro-vasodilatador mediado por NO (Kouloumenta y cols., 2006), lo cual también puede ser una explicación válida para la disminución de la respuesta máxima inducida por serotonina en el mismo grupo de machos hipóxicos. En cuanto a las hembras, significativamente se vio que aumentó la respuesta máxima a endotelina-1. Al respecto, se sabe que los estrógenos disminuyen la expresión de endotelina-1 y que esta molécula no solo cumple funciones relacionadas con la vasoconstricción, sino que además con la vasodilatación dependiendo del receptor y la localización de este (Smiley y cols., 2009; Cooke y cols., 2017). Por lo tanto, en hembras la ET-1 participaría principalmente en la regulación del tono vasoconstrictor por sobre el mecanismo que estimula la liberación de NO desde las células endoteliales a través de los receptores ET_B. Dado que el mecanismo vasoconstrictor estaría favorecido, el NO liberado no sería el suficiente para suprimir la síntesis de ET-1 con lo cual además se favorecería la remodelación vascular (McMurty y cols., 2003), que en este caso fue un aumento o proliferación de células musculares lisas con preservación de la función vasoconstrictora.

En cuanto a la función vasodilatadora, el análisis debe partir de la base de que para ambos géneros existió un aumento de la densidad endotelial con preservación de la función dependiente de endotelio, por lo tanto existe la posibilidad de que, si ocurrió

en ambos géneros, existe la posibilidad que la preservación y aumento del *vasa vasorum* haya permitido proveer de factores de crecimiento y células para la remodelación de la capa íntima para mantener la función y que además esto es independiente de las hormonas sexuales.

Respecto al colágeno, ambas arterias estudiadas se vieron afectadas, existiendo una disminución en cuanto a la proporción de colágeno presente en las arterias hipóxicas, siendo los machos los afectados. En el caso de las arterias carótidas, en machos existió una disminución global de la proporción de colágeno en ambas capas, no alcanzando la significancia estadística la separación por cada una de ellas. En el caso de las carótidas de las hembras, claramente mostraron una menor proporción de colágeno específicamente en la capa adventicia. En el caso de la arteria femoral, sólo los machos concentraron los cambios con significancia estadística, mostrando una disminución global y en la capa media. El colágeno es sintetizado por células musculares lisas, fibroblastos y miofibroblastos. Normalmente se atribuye a los fibroblastos la mayor parte del colágeno del tejido vascular (Akita y cols., 1993) y el mantenimiento de la matriz extracelular. Sin embargo, se sabe que los miofibroblastos también producen cantidades sustanciales de colágeno (Petrov y cols., 2002). Los fibroblastos pueden diferenciarse en miofibroblastos bajo diversos estímulos y condiciones patológicas y alterar la producción de colágeno (Wang y cols., 2003). Por ejemplo, la citokina TGF- β puede inducir la diferenciación de los fibroblastos en miofibroblastos y aumentar la producción de colágeno (Gao y cols., 2003). La ausencia de estímulos o la falta de llegada de las moléculas de señalización a las diferentes capas puede ser una causa de la falta de generación de colágeno, que podría corresponder al caso de la arteria carótida hipóxica en machos, en los cuales existió una disminución del *vasa vasorum*. Por otra parte, las arterias carótidas hipóxicas de las hembras pueden haber generado una disminución en la producción del colágeno en la adventicia a raíz de la migración de fibroblastos necesarios para mantener la capa media aumentada para preservar la función vasoconstrictora. En el caso de la arteria femoral, al contar con una mayor densidad en el *vasa vasorum*, tiene mayor posibilidad de asegurar un suministro de señalización a la capa más externa del vaso, para preservar la producción de colágeno, sin embargo, esta señalización o bien

no alcanzaría la capa media o bien existen otros factores en los que incluso pueda verse involucrado el TAPV que regulen el comportamiento secretor de los fibroblastos (Hyvelin y cols., 2005). La falta de producción de colágeno afecta las propiedades mecánicas de los vasos, restando posibilidad a la acumulación de energía potencia elástica, que cobra relevancia en la transmisión del pulso cardíaco, lo cual puede comprometer la irrigación periférica y predisponer a enfermedades. (Jenkins y cols., 2007).

CONCLUSIÓN

La gestación en hipoxia hipobárica crónica durante la segunda mitad de la gestación impacta la función vascular y la estructura de las arterias sistémicas estudiadas en los individuos adultos. La correlación entre la estructura y función determina que existen cambios que son respuesta directa del cambio estructural, mientras que otros cambios funcionales quedan enmascarados en posibles mecanismos de compensación. La profundización de estos cambios a través de estudios de las vías involucradas en la función y en los cambios morfológicos permitirían comprender los mecanismos involucrados y proponer posibles blancos farmacológicos para la prevención o tratamiento de los cambios cardiovasculares que se puedan dar en la vida adulta. Para este objetivo, este trabajo permitiría sentar las bases para complementar posteriormente con un estudio de biología molecular para evaluar expresión de moléculas y diferenciación celular, con lo cual mejoraría la precisión en la interpretación de los resultados. Adicionalmente, se hace necesario enmarcar este trabajo, como se ha estado haciendo, con otros estadios de vida de los individuos, considerando el dimorfismo sexual, con la finalidad de establecer temporalidad para los cambios observados en la vida de los individuos. Esto tiene gran relevancia al estar relacionado con enfermedades crónicas no transmisibles y dado el énfasis actual que se está dando a la prevención temprana, desde el cuidado de la madre. Adicionalmente, dado que se evidenciaron cambios estructurales, es necesario complementarlos estos hallazgos con estudios biomecánicos con lo cual se obtendrían datos relevantes respecto a la transmisión de energía desde el corazón y la relación la irrigación periférica, además de efectos potenciales de las fuerzas en el fenómeno de remodelación arterial. La relevancia de este trabajo y de los estudios en esta línea de investigación radica en que se estima que más de 80 millones de personas viven actualmente sobre los 2500 metros sobre el nivel del mar (Tremblay, 2021) y que adicionalmente, secundario a la globalización y apertura de fronteras, existen condiciones que favorecen la migración desde tierras bajas a las altas, que conllevan un riesgo para las madres gestantes. Adicionalmente, dado que no existen diferencias en cuanto a una hipoxia hipobárica crónica e intermitente respecto al impacto fisiológico (Badran y cols., 2019), la población objetivo en cuanto aplicabilidad incluso

se podría extender hasta a aquellos que realizan su trabajo en base a desplazamiento desde tierras bajas a tierras altas como la población minera. El amplio rango de población potencialmente afectado justifica el desarrollo de estrategias clínicas como un objetivo de salud pública de aplicabilidad mundial.

PROYECCIONES

Este trabajo ha permitido dar respuesta a un planteamiento previo realizado por Herrera y cols. (2007, 2010), en el cual se estableció que, en el fenómeno de remodelación en individuos sometidos a hipoxia hipobárica durante el periodo fetal, podría existir una reducción de la masa muscular lisa, comprometiendo la función contráctil. Este estudio demostró que en individuos adultos existieron cambios significativos en cuanto a la estructura y la correspondiente función, invitando a explorar factores que complementan los cambios estructurales para llegar a una teoría concreta que explique el cambio funcional desde el punto de vista molecular para encontrar y plantear un blanco terapéutico. Stenmark y cols., (2006) establecieron que la remodelación es altamente probable en condiciones de hipoxia durante el periodo fetal. Nuestro trabajo permite confirmar esta aseveración para individuos adultos en el modelo de cobayo, proponiendo posibles mecanismos involucrados. Por lo tanto, una proyección de este trabajo es justamente complementar con biología molecular para evaluar el real impacto de la morfología sobre la función y viceversa extendiendo la comparación hacia otras etapas de la vida del individuo como la neonatal, y adulto mayor.

PRODUCTOS CIENTIFICOS ASOCIADOS A LA TESIS

1. V Meeting of the Latin American Regional Society for Developmental Origins of Health and Disease (LA-DOHaD). Valdivia, September 4-6, 2023.

Late postnatal effects of hypobaric hypoxia during gestation on the carotid artery in guinea pigs.

Cristian Marambio¹, Adolfo A. Paz¹, Felipe A. Beñaldo¹, Tamara A. Jiménez¹, Emilio A. Herrera^{1,2*}

¹Laboratorio de Función y Reactividad Vascular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

²International Center for Andean Studies (INCAS); Universidad de Chile, Putre, Chile.

*Correspondence: eaherrera@uchile.cl

Background: Cardiovascular diseases (CVDs) are the leading cause of global mortality, and their incidence is increasing in the last decade¹. Gestational hypoxia, which occurs in high altitude populations ($\geq 2500\text{m}$), is related to an increased risk to develop CVDs in postnatal life, including cerebrovascular problems². In this study, we evaluate the effect of gestational hypoxia on the carotid morphology and arterial function in adult guinea pigs.

Methods: At gestational day 30, guinea pigs dams were introduced to a hypobaric chamber in normoxic (N, 720 torr, n=7) or hypoxic (H, 470 torr, n=7) conditions until term (~70 d). After delivery, individuals were euthanized at postnatal day 75 (adult) and carotid arteries were mounted in a wire myograph. Cumulative concentration- response curves (CCRC) to potassium chloride (KCl), phenylephrine (PE), endothelium-independent (Sodium nitroprusside-SNP) and -dependent (Methacholine-MetCh) were performed. Additionally, a histomorphological analysis was performed and all data were expressed as mean \pm SEM and compared by Mann-Whitney test. Significant differences were accepted when $p \leq 0.05$.

Results: Hypoxia reduced the maximal K⁺-induced response and SNP sensitivity, whereas it increased the maximal PE-induced response when compared with the normoxic group (Figure1). The adventitial layer of the hypoxic artery had a larger surface area and a greater number of arteries (*vasa vasorum*) than the normoxic artery. The hypoxic middle layer was thinner and had a greater cell density than the normoxic layer.

Conclusions: Hypobaric hypoxia during gestation alters vascular responses and structure of carotid artery in the adult life. The maximal response induced by PE could be related to a higher number of nuclei as a sample of proliferation to compensate for

a thinner medial layer relative to a normoxic artery. Further studies will assess the involved mechanisms and the persistence of these responses further in life.

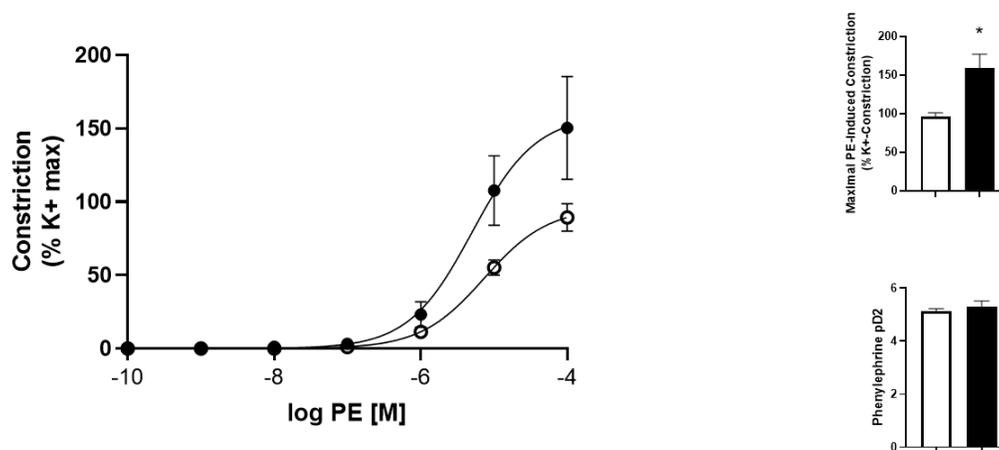


Figure 1. Response to phenylephrine in carotid artery. Contractile response to PE CCRC. Inset histograms correspond to maximal induced contractile response (upper histogram) and sensitivity (lower histogram). Normoxia (Nx, white, n=7); Hypoxia (Hx, black, n=7). Significant difference ($p \leq 0.05$): * vs Nx.

Keywords : Intrauterine hypoxia, Pregnancy, Vascular programming.

Funding : ANID 21191677, FONDECYT INICIO 11200798, FONDECYT Regular 1201283.

References

1. Roth G, Mensah G, Johnson C, et al. Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk Factors, 1990–2019. *J Am Coll Cardiol.*, 76 (25) 2982–021, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2020.11.010>
2. González-Candia A, Herrera EA. High altitude pregnancies and vascular dysfunction: observations from Latin American studies. *Front Physiol.* 12:786038, 2021. Doi: 10.3389/fphys.2021.786038.

Type of presentation: Oral.

2. XXVI Aniversario del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Independencia, enero 17, 2024.

Establishing the pulmonary characteristics of guinea pigs gestated under hypobaric hypoxia.

Paz AA¹, Jiménez TA¹, **Marambio CA**¹, Beñaldo FA¹, Figueroa EG², Frey J², González-Candia AA², Herrera EA^{1,3*}

¹Laboratorio de Función y Reactividad Vascular, ICBM, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

²Instituto de Ciencias de la Salud, Universidad de O'Higgins, Rancagua, Chile.

³International Center for Andean Studies (INCAS); Universidad de Chile, Putre, Chile. *Correspondence: eaherrera@uchile.cl

Background: Hypobaric hypoxic pregnancy (HHP) occurs in the high-altitude population, estimated in ~80 million, and is related to non-communicable cardiovascular diseases during adulthood^{1,2}. HHP induced postnatal pulmonary complications, such as pulmonary hypertension, characterized by lung remodeling, oxidative stress, and vasodilator dysfunction³. However, few is known about the integrative view of pulmonary structural and vasodilator-related protein expression effects of high-altitude pregnancy. Therefore, we aimed to determine the effects of high-altitude gestation in the pulmonary airway and vascular structure, and expression of proteins involved in vasodilation and oxidative balance of guinea pigs, a recognized translational animal model⁴.

Methods : All procedures were approved by the local Ethical Committee (20354-MED UCH). At gestational day 30 (term~70d), ten pregnant guinea pigs were introduced in a hypobaric chamber in simulated-normoxia (N, 720 torr, n=5) or -hypoxia (H, 470 torr, n=5) until term. After delivery, newborns were euthanized, and lungs were removed and processed for histology and protein extraction. Airway and vascular surface were quantified to total area ratio. Vasodilator-related enzymes (CBS, CTH, HO-1/2, eNOS), antioxidant enzymes (CAT, GPX1, SOD2, NRF2) and oxidative stress markers 4-HNE and 8-isoprostane expression were assessed by ELISA or Western-Blot. Data were analyzed by Mann-Whitney t test, and $p \leq 0.05$ was considered significant.

Results : Hypoxic animals exhibited lower body weight and similar lung to body weight ratio, these effects were accompanied by an increased airway surface in the cranial-dorsal area of the lungs. Vasodilator enzymes eNOS and CTH, and antioxidant-related proteins CAT and NRF2 were reduced by gestational hypoxia. Moreover, 8-isoprostane levels increased in the hypoxic group.

Conclusions: Gestational hypoxia affects physiological lung development of neonatal guinea pigs at multiple levels, including an altered alveolarization process, vasodilator deficit and an increased oxidative stress, which could have deleterious effects on lung function. Further studies will track the observed effects throughout adulthood.

Funding : Fondecyt Regular 1201283, Fondecyt de Inicio 11200798 and ANID 21191677.

References

1. Tremblay J.C & Ainslie PN. (2021). Global and country-level estimates of human population at high altitude. *PNAS USA*. 118(18), e2102463118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102463118>
2. González-Candia A & Herrera EA. (2021). High altitude pregnancies and vascular dysfunction: observations from Latin American studies. *Front Physiol*. 12:786038.
3. Papamatheakis DG, Blood AB, Kim JH, Wilson SM. (2013). Antenatal hypoxia and pulmonary vascular function and remodeling. *Curr Vasc Pharmacol*. 11(5), 616–640. <https://doi.org/10.2174/1570161111311050006>
4. Morrison, J. L., Botting, K. J., Darby, J., David, A. L., Dyson, R. M., Gatford, K. L., Gray, C., Herrera, E. A., Hirst, J. J., Kim, B., Kind, K. L., Krause, B. J., Matthews, S. G., Palliser, H. K., Regnault, T., Richardson, B. S., Sasaki, A., Thompson, L. P., & Berry, M. J. (2018). Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *J Physiol*. 596(23), 5535–5569. <https://doi.org/10.1113/JP274948>

Type of presentation: Poster.

3. **Aniversario del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina,** Universidad de Chile. Independencia, enero 17, 2024.

Shifting in cardiac health during life in a guinea pig model gestated in intrauterine hypoxia.

Beñaldo FA^{1†}, Paz AA¹, Jiménez TA¹, **Marambio CA**¹, González-Candia AA², Herrera EA¹.

¹Vascular Function & Reactivity Lab, Pathophysiology Program, ICBM, Faculty of Medicine, Universidad de Chile.

²Institute of Health Sciences, Universidad de O'Higgins, Rancagua, Chile.

[†]Principal author. Correspondence: eaherrera@uchile.cl

Background: Intrauterine hypoxia is one of the most common complications in pregnancy with a mortality rate of 26% in Chile. During this stage, epigenetic modifications of DNA, caused by increased oxidative stress, improve the methylation patterns, which can program the appearance of cardiovascular diseases during several stages of life. However, cardiovascular health studies mostly describe these effects in the short (neonatal) and medium term (young adult). Therefore, our study attempts to characterize cardiac health in young and adult guinea pig offspring who were exposed to hypoxia during gestation.

Methods : Male litters were divided into two groups: young (two and half months P75, normoxic (Nx): 6, hypoxic (Hx); 5) and adult (one-year P365, Nx: 3, Hx: 10). The hypoxia groups were induced by a hypobaric chamber, 3800 m or 470 torr from day 30-70 days of their pregnancies. After euthanasia, the heart was mounted in a Langendorff system, with temperature-regulated (37°)/retrogradely perfused via the ascending aorta. The perfused flow was used to generate a constant perfusion pressure of 60-80 mmHg with a left ventricle c pressure (LVEDP) of 5-15 mmHg. The protocol was 30min of basal condition, 30min of ischemia, and 120min of reperfusion. Then, the heart was perfused with Tetrazolium chloride (TTC), frozen, cut into rings, stored in formaldehyde, and 24h later photographs were taken to verify infarcted areas. All data are expressed as mean \pm SEM. Langendorff's analysis was compared by one- or two-ways ANOVA. Infarcted areas were compared by Mann-Whitney t-test. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (CICUA), University of Chile (2034-MED-UCH).

Results : The Nx P75 guinea pigs showed improved cardiac responses (left ventricular development pressure (LVDP), min dP/dt and max dP/dt) during early reperfusion after ischemia compared to Hx P75. However, these cardiac responses shifted in the P365 groups. The LVEDP was blunted in the hypoxic P365 animals. Also, the LVDP have a lesser decrease in the Hx P365. The systolic and diastolic responses (max dP/dt and min dP/dt, respectively) were enhanced in the Hx vs Nx P365 groups. The contractility of Hx P365 was ameliorated during reperfusion compared to Nx response. There are no differences in the infarcted areas between groups in the different ages.

Conclusions: We expected a worse cardiac response in hypoxic animals throughout their lives, verified in the medium term. However, hypoxic 1-year-old hearts have suffered enough time to prepare for the onset of diseases. Future studies will seek to determine if the expression and/or function of several enzymes (eNOS, HOs, CBS/CSE or PKCe) are involved in this pre-conditioning in the long term.

Funding : Fondecyt Regular 1201283, Fondecyt de Inicio 11200798 and ANID 21191677.

References

1. González-Candía A & Herrera EA. (2021). High altitude pregnancies and vascular dysfunction: observations from Latin American studies. *Front Physiol.* 12:786038. 3.
2. Papamatheakis DG, Blood AB, Kim JH, Wilson SM. (2013). Antenatal hypoxia and pulmonary vascular function and remodeling. *Curr Vasc Pharmacol.* 11(5), 616–640. <https://doi.org/10.2174/1570161111311050006>
3. Morrison, J. L., Botting, K. J., Darby, J., David, A. L., Dyson, R. M., Gatford, K. L., Gray, C., Herrera, E. A., Hirst, J. J., Kim, B., Kind, K. L., Krause, B. J., Matthews, S. G., Palliser, H. K., Regnault, T., Richardson, B. S., Sasaki, A., Thompson, L. P., & Berry, M. J. (2018). Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *J Physiol.* 596(23), 5535–5569. <https://doi.org/10.1113/JP274948>

Type of presentation: Poster.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aguilar, M., González-Candia, A., Rodríguez, J., Carrasco-Pozo, C., Cañas, D., García-Herrera, C., Herrera, E. A., & Castillo, R. L. (2018). Mechanisms of cardiovascular protection associated with intermittent hypobaric hypoxia exposure in a rat model: Role of oxidative stress. *International journal of molecular sciences*, 19(2), 366. <https://doi.org/10.3390/ijms19020366>
2. Akita, M., Murata, E., Schröter-Kermani, C., & Merker, H. J. (1993). Type I collagen synthesis in cultured aortic smooth muscle cells from spontaneously hypertensive rats and normotensive control, Wistar-Kyoto rats. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 61(2), 98–103. <https://doi.org/10.1159/000163769>
3. Allison, B. J., Brain, K. L., Niu, Y., Kane, A. D., Herrera, E. A., Thakor, A. S., Botting, K. J., Cross, C. M., Itani, N., Skeffington, K. L., Beck, C., & Giussani, D. A. (2016). Fetal in vivo continuous cardiovascular function during chronic hypoxia. *The Journal of physiology*, 594(5), 1247–1264. <https://doi.org/10.1113/JP271091>
4. Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS. *Animais de laboratório: criação e experimentação*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002. 388
5. Armati-Gulson, P., & Burnstock, G. (1983). The development of adrenergic innervation in some human foetal blood vessels. *Journal of the autonomic nervous system*, 7(2), 111–118. [https://doi.org/10.1016/0165-1838\(83\)90040-1](https://doi.org/10.1016/0165-1838(83)90040-1)
6. Arras, M., Ito, W. D., Scholz, D., Winkler, B., Schaper, J., & Schaper, W. (1998). Monocyte activation in angiogenesis and collateral growth in the rabbit hindlimb. *The Journal of clinical investigation*, 101(1), 40–50. <https://doi.org/10.1172/JCI119877>
7. Astorga, C. R., González-Candia, A., Candia, A. A., Figueroa, E. G., Cañas, D., Ebersperger, G., Reyes, R. V., Llanos, A. J., & Herrera, E. A. (2018). Melatonin decreases pulmonary vascular remodeling and oxygen sensitivity in pulmonary hypertensive newborn lambs. *Frontiers in physiology*, 9, 185. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00185>
8. Ayme-Dietrich, E., Aubertin-Kirch, G., Maroteaux, L., & Monassier, L. (2017). Cardiovascular remodeling and the peripheral serotonergic system. *Archives of cardiovascular diseases*, 110(1), 51–59. <https://doi.org/10.1016/j.acvd.2016.08.002>

9. Baratchi, S., Khoshmanesh, K., Woodman, O. L., Potocnik, S., Peter, K., & McIntyre, P. (2017). Molecular sensors of blood flow in endothelial cells. *Trends in molecular medicine*, 23(9), 850–868. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2017.07.007>
10. Barnes, P. J., & Liu, S. F. (1995). Regulation of pulmonary vascular tone. *Pharmacological reviews*, 47(1), 87–131.
11. Battista, M. C., Oligny, L. L., St-Louis, J., & Brochu, M. (2002). Intrauterine growth restriction in rats is associated with hypertension and renal dysfunction in adulthood. *American Journal of Physiology. Endocrinology and metabolism*, 283(1), E124–E131. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00004.2001>
12. Bény, J. L., Nguyen, M. N., Marino, M., & Matsui, M. (2008). Muscarinic receptor knockout mice confirm involvement of M3 receptor in endothelium-dependent vasodilatation in mouse arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 51(5), 505–512. <https://doi.org/10.1097/FJC.0b013e31816d5f2f>
13. Berry, M., Gray, C., Wright, K., Dyson, R., & Wright, I. (2015). Premature guinea pigs: a new paradigm to investigate the late effects of preterm birth. *Journal of developmental origins of health and disease*, 6(2), 143–148. <https://doi.org/10.1017/S2040174414000592>
14. Blackmore, H. L., & Ozanne, S. E. (2015). Programming of cardiovascular disease across the life-course. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 83, 122–130. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2014.12.006>
15. Bradley, T. J., Potts, J. E., Lee, S. K., Potts, M. T., De Souza, A. M., & Sandor, G. G. (2010). Early changes in the biophysical properties of the aorta in pre-adolescent children born small for gestational age. *The Journal of pediatrics*, 156(3), 388–392. <https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2009.10.002>
16. Briscoe, T. A., Rehn, A. E., Dieni, S., Duncan, J. R., Wlodek, M. E., Owens, J. A., & Rees, S. M. (2004). Cardiovascular and renal disease in the adolescent guinea pig after chronic placental insufficiency. *American journal of obstetrics and gynecology*, 191(3), 847–855. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2004.01.050>
17. Brüggmann, D., Lips, K. S., Pfeil, U., Haberberger, R. V., & Kummer, W. (2002). Multiple nicotinic acetylcholine receptor alpha-subunits are expressed in the arterial

system of the rat. *Histochemistry and cell biology*, 118(6), 441–447. <https://doi.org/10.1007/s00418-002-0475-2>

18. Cañas, D., Herrera, E. A., García-Herrera, C., Celentano, D., & Krause, B. J. (2017). Fetal growth restriction induces heterogeneous effects on vascular biomechanical and functional properties in guinea pigs (*Cavia porcellus*). *Frontiers in Physiology*, 8, 144. <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00144>

19. Carmeliet, P., & Jain, R. K. (2000). Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407(6801), 249–257. <https://doi.org/10.1038/35025220>

20. Cheng, X. M., Hu, Y. Y., Yang, T., Wu, N., & Wang, X. N. (2022). Reactive oxygen species and oxidative stress in vascular-related diseases. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2022, 7906091. <https://doi.org/10.1155/2022/7906091>

21. Constância, M., Kelsey, G., & Reik, W. (2004). Resourceful imprinting. *Nature*, 432(7013), 53–57. <https://doi.org/10.1038/432053a>

22. Cooke, P. S., Nanjappa, M. K., Ko, C., Prins, G. S., & Hess, R. A. (2017). Estrogens in male physiology. *Physiological reviews*, 97(3), 995–1043. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2016>

23. Coppel, J., Hennis, P., Gilbert-Kawai, E., & Grocott, M. P. (2015). The physiological effects of hypobaric hypoxia versus normobaric hypoxia: a systematic review of crossover trials. *Extreme physiology & medicine*, 4, 2. <https://doi.org/10.1186/s13728-014-0021-6>

24. Dauphin, F., & Hamel, E. (1990). Muscarinic receptor subtype mediating vasodilation feline middle cerebral artery exhibits M3 pharmacology. *European journal of pharmacology*, 178(2), 203–213. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(90\)90476-m](https://doi.org/10.1016/0014-2999(90)90476-m)

25. Dikalova, A., Aschner, J. L., Kaplowitz, M. R., Summar, M., & Fike, C. D. (2016). Tetrahydrobiopterin oral therapy recouples eNOS and ameliorates chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension in newborn pigs. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*, 311(4), L743–L753. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00238.2016>

26. Dickinson, H., Moss, T. J., Gatford, K. L., Moritz, K. M., Akison, L., Fullston, T., Hryciw, D. H., Maloney, C. A., Morris, M. J., Wooldridge, A. L., Schjenken, J. E., Robertson, S. A., Waddell, B. J., Mark, P. J., Wyrwoll, C. S., Ellery, S. J., Thornburg,

- K. L., Muhlhausler, B. S., & Morrison, J. L. (2016). A review of fundamental principles for animal models of DOHaD research: an Australian perspective. *Journal of developmental origins of health and disease*, 7(5), 449–472. <https://doi.org/10.1017/S2040174416000477>
27. Dolinoy D. C. (2008). The agouti mouse model: an epigenetic biosensor for nutritional and environmental alterations on the fetal epigenome. *Nutrition reviews*, 66 Suppl 1(Suppl 1), S7–S11. <https://doi.org/10.1111/j.1753-4887.2008.00056.x>
28. Ducsay, C. A., Goyal, R., Pearce, W. J., Wilson, S., Hu, X. Q., & Zhang, L. (2018). Gestational hypoxia and developmental plasticity. *Physiological Reviews*, 98(3), 1241–1334. <https://doi.org/10.1152/physrev.00043.2017>
29. Esteve, J. M., Launay, J. M., Kellermann, O., & Maroteaux, L. (2007). Functions of serotonin in hypoxic pulmonary vascular remodeling. *Cell biochemistry and biophysics*, 47(1), 33–44. <https://doi.org/10.1385/cbb:47:1:33>
30. Ferrara, N., & Davis-Smyth, T. (1997). The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Reviews*, 18(1), 4–25. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.1.0287>
31. Figueroa, E. G., González-Candia, A., Villanueva, C. A., Ebensperger, G., Reyes, R. V., Llanos, A. J., & Herrera, E. A. (2021). Beneficial effects of melatonin on prostanoids pathways in pulmonary hypertensive neonates. *Vascular pharmacology*, 138, 106853. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2021.106853>
32. Fowden, A. L., Li, J., & Forhead, A. J. (1998). Glucocorticoids and the preparation for life after birth: are there long-term consequences of the life insurance? *The Proceedings of the Nutrition Society*, 57(1), 113–122. <https://doi.org/10.1079/pns19980017>
33. Fowden, A. L., Giussani, D. A., & Forhead, A. J. (2006). Intrauterine programming of physiological systems: causes and consequences. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21, 29–37. <https://doi.org/10.1152/physiol.00050.2005>
34. Fowden, A. L., Camm, E. J., & Sferruzzi-Perri, A. N. (2021). Effects of maternal obesity on placental phenotype. *Current vascular pharmacology*, 19(2), 113–131. <https://doi.org/10.2174/1570161118666200513115316>
35. Gao, P. J., Li, Y., Sun, A. J., Liu, J. J., Ji, K. D., Zhang, Y. Z., Sun, W. L., Marche, P., & Zhu, D. L. (2003). Differentiation of vascular myofibroblasts induced by

transforming growth factor-beta1 requires the involvement of protein kinase Calpha. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 35(9), 1105–1112. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(03\)00207-4](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(03)00207-4)

36. Gao, Y., & Raj, J. U. (2010). Regulation of the pulmonary circulation in the fetus and newborn. *Physiological Reviews*, 90(4), 1291–1335. <https://doi.org/10.1152/physrev.00032.2009>

37. Gao, Y., Cornfield, D. N., Stenmark, K. R., Thébaud, B., Abman, S. H., & Raj, J. U. (2016). Unique aspects of the developing lung circulation: structural development and regulation of vasomotor tone. *Pulmonary Circulation*, 6(4), 407–425. <https://doi.org/10.1086/688890>

38. Gao, Yuansheng. (2017). Biology of vascular smooth muscle: Vasoconstriction and dilatation. 10.1007/978-981-10-4810-4.

39. Giussani, D. A., & Davidge, S. T. (2013). Developmental programming of cardiovascular disease by prenatal hypoxia. *Journal of developmental origins of health and disease*, 4(5), 328–337. <https://doi.org/10.1017/S204017441300010X>

40. Giussani, D. A., Niu, Y., Herrera, E. A., Richter, H. G., Camm, E. J., Thakor, A. S., Kane, A. D., Hansell, J. A., Brain, K. L., Skeffington, K. L., Itani, N., Wooding, F. B., Cross, C. M., & Allison, B. J. (2014). Heart disease link to fetal hypoxia and oxidative stress. *Advances in experimental medicine and biology*, 814, 77–87. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1031-1_7

41. Giussani D. A. (2016). The fetal brain sparing response to hypoxia: physiological mechanisms. *The Journal of physiology*, 594(5), 1215–1230. <https://doi.org/10.1113/JP271099>

42. Giussani D. A. (2021). Breath of Life: Heart Disease Link to Developmental Hypoxia. *Circulation*, 144(17), 1429–1443. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.121.054689>

43. Global Cardiovascular Risk Consortium, Magnussen, C., Ojeda, F. M., Leong, D. P., Alegre-Diaz, J., Amouyel, P., Aviles-Santa, L., De Bacquer, D., Ballantyne, C. M., Bernabé-Ortiz, A., Bobak, M., Brenner, H., Carrillo-Larco, R. M., de Lemos, J., Dobson, A., Dörr, M., Donfrancesco, C., Drygas, W., Dullaart, R. P., Engström, G., ... Blankenberg, S. (2023). Global effect of modifiable risk factors on cardiovascular

disease and mortality. *The New England journal of medicine*, 389(14), 1273–1285. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2206916>

44. Gluckman, P. D., Hanson, M. A., Cooper, C., & Thornburg, K. L. (2008). Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England journal of medicine*, 359(1), 61–73. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0708473>

45. Gonzalez-Candia, A., & Herrera, E. A. (2021). High Altitude Pregnancies and Vascular Dysfunction: Observations from Latin American Studies. *Frontiers in physiology*, 12, 786038. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.786038>

46. González-Candia, A., Candia, A. A., Arias, P. V., Paz, A. A., Herrera, E. A., & Castillo, R. L. (2023). Chronic intermittent hypobaric hypoxia induces cardiovascular dysfunction in a high-altitude working shift model. *Life sciences*, 326, 121800. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2023.121800>

47. Götschke, J., Mertsch, P., Kneidinger, N., Kauffmann-Guerrero, D., Behr, J., Huber, R. M., Reichenberger, F., & Milger, K. (2018). Daily chronic intermittent hypobaric hypoxia does not induce chronic increase in pulmonary arterial pressure assessed by echocardiography. *Canadian respiratory journal*, 2018, 9649716. <https://doi.org/10.1155/2018/9649716>

48. Goyal, D., Limesand, S. W., & Goyal, R. (2019). Epigenetic responses and the developmental origins of health and disease. *The Journal of endocrinology*, 242(1), T105–T119. <https://doi.org/10.1530/JOE-19-0009>

49. Goyal, R., Papamatheakis, D. G., Loftin, M., Vrancken, K., Dawson, A. S., Osman, N. J., Blood, A. B., Pearce, W. J., Longo, L. D., & Wilson, S. M. (2011). Long-term maternal hypoxia: the role of extracellular Ca²⁺ entry during serotonin-mediated contractility in fetal ovine pulmonary arteries. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 18(10), 948–962. <https://doi.org/10.1177/1933719111401660>

50. Hanson, M., & Gluckman, P. (2011). Developmental origins of noncommunicable disease: population and public health implications. *The American journal of clinical nutrition*, 94(6 Suppl), 1754S–1758S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001206>

51. Harding, J. E., & Johnston, B. M. (1995). Nutrition and fetal growth. *Reproduction, fertility, and development*, 7(3), 539–547. <https://doi.org/10.1071/rd9950539>
52. Harvey R. D. (2012). Muscarinic receptor agonists and antagonists: effects on cardiovascular function. *Handbook of experimental pharmacology*, (208), 299–316. https://doi.org/10.1007/978-3-642-23274-9_13
53. Herrera, E. A., Pulgar, V. M., Riquelme, R. A., Sanhueza, E. M., Reyes, R. V., Ebensperger, G., Parer, J. T., Valdéz, E. A., Giussani, D. A., Blanco, C. E., Hanson, M. A., & Llanos, A. J. (2007). High-altitude chronic hypoxia during gestation and after birth modifies cardiovascular responses in newborn sheep. *American journal of physiology. Regulatory, integrative, and comparative physiology*, 292(6), R2234–R2240. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00909.2006>
54. Herrera, E. A., Riquelme, R. A., Ebensperger, G., Reyes, R. V., Ulloa, C. E., Cabello, G., Krause, B. J., Parer, J. T., Giussani, D. A., & Llanos, A. J. (2010). Long-term exposure to high-altitude chronic hypoxia during gestation induces neonatal pulmonary hypertension at sea level. *American journal of physiology. Regulatory, integrative, and comparative physiology*, 299(6), R1676–R1684. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00123.2010>
55. Herrera, E. A., Farías, J. G., Ebensperger, G., Reyes, R. V., Llanos, A. J., & Castillo, R. L. (2015). Pharmacological approaches in either intermittent or permanent hypoxia: A tale of two exposures. *Pharmacological research*, 101, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2015.07.011>
56. Herrera, E. A., Farías, J. G., González-Candia, A., Short, S. E., Carrasco-Pozo, C., & Castillo, R. L. (2015). Ω 3 Supplementation and intermittent hypobaric hypoxia induce cardioprotection enhancing antioxidant mechanisms in adult rats. *Marine drugs*, 13(2), 838–860. <https://doi.org/10.3390/md13020838>
57. Herrera, E. A., Rojas, R. T., Krause, B. J., Ebensperger, G., Reyes, R. V., Giussani, D. A., Parer, J. T., & Llanos, A. J. (2016). Cardiovascular function in term fetal sheep conceived, gestated, and studied in the hypobaric hypoxia of the Andean altiplano. *The Journal of physiology*, 594(5), 1231–1245. <https://doi.org/10.1113/JP271110>

58. Herrera, E. A., Alegría, R., Farias, M., Díaz-López, F., Hernández, C., Uauy, R., Regnault, T. R., Casanello, P., & Krause, B. J. (2016). Assessment of in vivo fetal growth and placental vascular function in a novel intrauterine growth restriction model of progressive uterine artery occlusion in guinea pigs. *The Journal of physiology*, 594(6), 1553–1561. <https://doi.org/10.1113/JP271467>
59. Herrera, E. A., Cifuentes-Zúñiga, F., Figueroa, E., Villanueva, C., Hernández, C., Alegría, R., Arroyo-Jousse, V., Peñaloza, E., Farías, M., Uauy, R., Casanello, P., & Krause, B. J. (2017). N-Acetylcysteine, a glutathione precursor, reverts vascular dysfunction and endothelial epigenetic programming in intrauterine growth restricted guinea pigs. *The Journal of physiology*, 595(4), 1077–1092. <https://doi.org/10.1113/JP273396>
60. Hu, Y., Davison, F., Zhang, Z., & Xu, Q. (2003). Endothelial replacement and angiogenesis in arteriosclerotic lesions of allografts are contributed by circulating progenitor cells. *Circulation*, 108(25), 3122–3127. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000105722.96112.67>
61. Hubbell, M. C., Semotiuk, A. J., Thorpe, R. B., Adeoye, O. O., Butler, S. M., Williams, J. M., Khorram, O., & Pearce, W. J. (2012). Chronic hypoxia and VEGF differentially modulate abundance and organization of myosin heavy chain isoforms in fetal and adult ovine arteries. *American journal of physiology. Cell physiology*, 303(10), C1090–C1103. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00408.2011>
62. Hubrecht R. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory and other research animals*. 8th. Bognor Regis: UFAW/Wiley-Blackwell; 2010. pp. 380–398.
63. Huicho, L., & Niermeyer, S. (2006). Cardiopulmonary pathology among children resident at high altitude in Tintaya, Peru: a cross-sectional study. *High altitude medicine & biology*, 7(2), 168–179. <https://doi.org/10.1089/ham.2006.7.168>
64. Hyvelin, J. M., Howell, K., Nichol, A., Costello, C. M., Preston, R. J., & McLoughlin, P. (2005). Inhibition of rho-kinase attenuates hypoxia-induced angiogenesis in the pulmonary circulation. *Circulation research*, 97(2), 185–191. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000174287.17953.83>

65. Itani, N., Salinas, C. E., Villena, M., Skeffington, K. L., Beck, C., Villamor, E., Blanco, C. E., & Giussani, D. A. (2018). The highs and lows of programmed cardiovascular disease by developmental hypoxia: studies in the chicken embryo. *The Journal of physiology*, 596(15), 2991–3006. <https://doi.org/10.1113/JP274111>
66. Ito, T., Ikeda, U., Shimpo, M., Yamamoto, K., & Shimada, K. (2000). Serotonin increases interleukin-6 synthesis in human vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 102(20), 2522–2527. <https://doi.org/10.1161/01.cir.102.20.2522>
67. Jaitovich, A., & Jourd'heuil, D. (2017). A brief overview of nitric oxide and reactive oxygen species signaling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*, 967, 71–81. https://doi.org/10.1007/978-3-319-63245-2_6
68. Jenkins, C., Milsted, A., Doane, K., Meszaros, G., Toot, J., & Ely, D. (2007). A cell culture model using rat coronary artery adventitial fibroblasts to measure collagen production. *BMC cardiovascular disorders*, 7, 13. <https://doi.org/10.1186/1471-2261-7-13>
69. Kaliste E. *The welfare of laboratory animals*. 2nd. Dordrecht: Springer; 2007. pp. 181–209
70. Keyes, L. E., Armaza, J. F., Niermeyer, S., Vargas, E., Young, D. A., & Moore, L. G. (2003). Intrauterine growth restriction, preeclampsia, and intrauterine mortality at high altitude in Bolivia. *Pediatric research*, 54(1), 20–25. <https://doi.org/10.1203/01.PDR.0000069846.64389.DC>
71. Kim, J., Choi, I. Y., Dong, Y., Wang, W. T., Brooks, W. M., Weiner, C. P., & Lee, P. (2015). Chronic fetal hypoxia affects axonal maturation in guinea pigs during development: A longitudinal diffusion tensor imaging and T2 mapping study. *Journal of magnetic resonance imaging: JMRI*, 42(3), 658–665. <https://doi.org/10.1002/jmri.24825>
72. Kouloumenta, V., Hatziefthimiou, A., Paraskeva, E., Gourgoulianis, K., & Molyvdas, P. A. (2006). Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *British journal of pharmacology*, 149(8), 1083–1091. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706936>

73. Krause, B. J., Carrasco-Wong, I., Caniuguir, A., Carvajal, J., Farías, M., & Casanello, P. (2013). Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels. *Placenta*, 34(1), 20–28. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2012.09.015>
74. Krause, B. J., Peñaloza, E., Candia, A., Cañas, D., Hernández, C., Arenas, G. A., Peralta-Scholz, M. J., Valenzuela, R., García-Herrera, C., & Herrera, E. A. (2019). Adult vascular dysfunction in foetal growth-restricted guinea-pigs is associated with a neonate-adult switching in Nos3 DNA methylation. *Acta physiologica (Oxford, England)*, 227(3), e13328. <https://doi.org/10.1111/apha.13328>
75. Lapchik VBV, Mattaraia VGM, Ko GM. Cuidados e manejos de animais de laboratório. 2ª Rio de Janeiro: Atheneu; 2017.
76. Li, Y., & O'Neill, C. (2012). Persistence of cytosine methylation of DNA following fertilisation in the mouse. *PloS one*, 7(1), e30687. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030687>
77. Libby, P., & Hansson, G. K. (2015). Inflammation and immunity in diseases of the arterial tree: players and layers. *Circulation research*, 116(2), 307–311. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.301313>
78. Lincoln, T. M., Komalavilas, P., & Cornwell, T. L. (1994). Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP-dependent protein kinase. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 23(6 Pt 2), 1141–1147. <https://doi.org/10.1161/01.hyp.23.6.1141>
79. Liu, P. Y., Christian, R. C., Ruan, M., Miller, V. M., & Fitzpatrick, L. A. (2005). Correlating androgen and estrogen steroid receptor expression with coronary calcification and atherosclerosis in men without known coronary artery disease. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 90(2), 1041–1046. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1211>
80. Liu, Q., Palmgren, V. A. C., Danen, E. H., & Le Dévédec, S. E. (2022). Acute vs. chronic vs. intermittent hypoxia in breast Cancer: a review on its application in in vitro research. *Molecular biology reports*, 49(11), 10961–10973. <https://doi.org/10.1007/s11033-022-07802-6>
81. Loeber, C., Goldberg, S. J., Hendrix, M. J., & Sahn, D. J. (1983). Dynamic mammalian cardiogenesis investigated by high-resolution ultrasound in guinea pigs.

Circulation, 68(4), 841–845. <https://doi.org/10.1161/01.cir.68.4.841>

82. Machida, T., Iizuka, K., & Hirafuji, M. (2013). 5-hydroxytryptamine and its receptors in systemic vascular walls. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 36(9), 1416–1419. <https://doi.org/10.1248/bpb.b13-00344>

83. Martin, H., Gazelius, B., & Norman, M. (2000). Impaired acetylcholine-induced vascular relaxation in low-birth-weight infants: implications for adult hypertension? *Pediatric research*, 47(4 Pt 1), 457–462. <https://doi.org/10.1203/00006450-200004000-00008>

84. Mauban, J. R., Wilkinson, K., Schach, C., & Yuan, J. X. (2006). Histamine-mediated increases in cytosolic $[Ca^{2+}]$ involve different mechanisms in human pulmonary artery smooth muscle and endothelial cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 290(2), C325–C336. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00236.2005>

85. McGrath, J. J., Procházka, J., Pelouch, V., & Ostádal, B. (1973). Physiological responses of rats to intermittent high-altitude stress: effects of age. *Journal of applied physiology*, 34(3), 289–293. <https://doi.org/10.1152/jappl.1973.34.3.289>

86. McMillen, I. C., & Robinson, J. S. (2005). Developmental origins of the metabolic syndrome: prediction, plasticity, and programming. *Physiological reviews*, 85(2), 571–633. <https://doi.org/10.1152/physrev.00053.2003>

87. McMurtry, I. F., Bauer, N. R., Fagan, K. A., Nagaoka, T., Gebb, S. A., & Oka, M. (2003). Hypoxia and rho/rho-kinase signaling. Lung development versus hypoxic pulmonary hypertension. *Advances in experimental medicine and biology*, 543, 127–137.

88. Meerson, F. Z., Ustinova, E. E., & Manukhina, E. B. (1989). Prevention of cardiac arrhythmias by adaptation to hypoxia: regulatory mechanisms and cardiotropic effect. *Biomedica biochimica acta*, 48(2-3), S83–S88.

89. Miller, S. L., Huppi, P. S., & Mallard, C. (2016). The consequences of fetal growth restriction on brain structure and neurodevelopmental outcome. *The Journal of physiology*, 594(4), 807–823. <https://doi.org/10.1113/JP271402>

90. Morrison, J. L., Botting, K. J., Darby, J., David, A. L., Dyson, R. M., Gattford, K. L., Gray, C., Herrera, E. A., Hirst, J. J., Kim, B., Kind, K. L., Krause, B. J., Matthews, S. G., Palliser, H. K., Regnault, T., Richardson, B. S., Sasaki, A., Thompson, L. P., &

Berry, M. J. (2018). Guinea pig models for translation of the developmental origins of health and disease hypothesis into the clinic. *The Journal of physiology*, 596(23), 5535–5569. <https://doi.org/10.1113/JP274948>

91. Moulton, K. S., Vakili, K., Zurakowski, D., Soliman, M., Butterfield, C., Sylvin, E., Lo, K. M., Gillies, S., Javaherian, K., & Folkman, J. (2003). Inhibition of plaque neovascularization reduces macrophage accumulation and progression of advanced atherosclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(8), 4736–4741. <https://doi.org/10.1073/pnas.0730843100>

92. Nadeev, A. D., Zharkikh, I. L., Avdonin, P. V., & Goncharov, N. V. (2014). *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologija*, 77(5), 32–37.

93. Neubig, R. R., Spedding, M., Kenakin, T., Christopoulos, A., & International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification (2003). International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacological reviews*, 55(4), 597–606. <https://doi.org/10.1124/pr.55.4.4>

94. Nooney, J. M., Peters, J. A., & Lambert, J. J. (1992). A patch clamp study of the nicotinic acetylcholine receptor of bovine adrenomedullary chromaffin cells in culture. *The Journal of physiology*, 455, 503–527. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1992.sp019314>

95. O'Donnell, S. R., & Saar, N. (1975). Some evidence for the maturity of peripheral adrenergic nerves in new-born guinea-pigs. *The Australian journal of experimental biology and medical science*, 53(3), 215–222. <https://doi.org/10.1038/icb.1975.22>

96. Oh, C., Dong, Y., Liu, H., & Thompson, L. P. (2008). Intrauterine hypoxia upregulates proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in fetal guinea pig hearts. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 199(1), 78.e1–78. e786. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2007.12.004>

97. Omar, A., Chatterjee, T. K., Tang, Y., Hui, D. Y., & Weintraub, N. L. (2014). Proinflammatory phenotype of perivascular adipocytes. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 34(8), 1631–1636. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.114.303030>

98. Ozanne, S. E., & Hales, C. N. (2002). Early programming of glucose-insulin metabolism. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 13(9), 368–373. [https://doi.org/10.1016/s1043-2760\(02\)00666-5](https://doi.org/10.1016/s1043-2760(02)00666-5)
99. Petrov, V. V., Fagard, R. H., & Lijnen, P. J. (2002). Stimulation of collagen production by transforming growth factor-beta1 during differentiation of cardiac fibroblasts to myofibroblasts. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 39(2), 258–263. <https://doi.org/10.1161/hy0202.103268>
100. Pintérová, M., Kuneš, J., & Zicha, J. (2011). Altered neural and vascular mechanisms in hypertension. *Physiological research*, 60(3), 381–402. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932189>
101. Reslan, O. M., & Khalil, R. A. (2012). Vascular effects of estrogenic menopausal hormone therapy. *Reviews on recent clinical trials*, 7(1), 47–70. <https://doi.org/10.2174/157488712799363253>
102. Rhind, S. M., Rae, M. T., & Brooks, A. N. (2001). Effects of nutrition and environmental factors on the fetal programming of the reproductive axis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 122(2), 205–214. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1220205>
103. Rook, W., Johnson, C. D., Coney, A. M., & Marshall, J. M. (2014). Prenatal hypoxia leads to increased muscle sympathetic nerve activity, sympathetic hyperinnervation, premature blunting of neuropeptide Y signaling, and hypertension in adult life. *Hypertension (Dallas, Tex.: 1979)*, 64(6), 1321–1327. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04374>
104. Ruijtenbeek, K., Kessels, C. G., Janssen, B. J., Bitsch, N. J., Fazzi, G. E., Janssen, G. M., De Mey, J., & Blanco, C. E. (2003). Chronic moderate hypoxia during in ovo development alters arterial reactivity in chickens. *Pflugers Archiv: European journal of physiology*, 447(2), 158–167. <https://doi.org/10.1007/s00424-003-1170-4>
105. Ryznar, R. J., Phibbs, L., & Van Winkle, L. J. (2021). Epigenetic modifications at the center of the Barker hypothesis and their transgenerational implications. *International journal of environmental research and public health*, 18(23), 12728. <https://doi.org/10.3390/ijerph182312728>
106. Saternos, H. C., Almarghalani, D. A., Gibson, H. M., Meqdad, M. A., Antypas, R. B., Lingireddy, A., & AbouAlaiwi, W. A. (2018). Distribution and function of the

muscarinic receptor subtypes in the cardiovascular system. *Physiological genomics*, 50(1), 1–9. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00062.2017>

107. Schneider, D., Hernández, C., Farías, M., Uauy, R., Krause, B. J., & Casanello, P. (2015). Oxidative stress as common trait of endothelial dysfunction in chorionic arteries from fetuses with IUGR and LGA. *Placenta*, 36(5), 552–558. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.02.003>

108. Shaw, J. C., Palliser, H. K., Dyson, R. M., Hirst, J. J., & Berry, M. J. (2016). Long-term effects of preterm birth on behavior and neurosteroid sensitivity in the guinea pig. *Pediatric research*, 80(2), 275–283. <https://doi.org/10.1038/pr.2016.63>

109. Shomer NH, Holcombe H, Harkness JE. Biology and diseases of guinea pigs. *Laboratory Animal Medicine*. 2015:247–83. doi: 10.1016/B978-0-12-409527-4.00006-7. Epub 2015 Jul 10. PMID: PMC7158311

110. Simpson, L. L., Busch, S. A., Oliver, S. J., Ainslie, P. N., Stenbridge, M., Steinback, C. D., & Moore, J. P. (2019). Baroreflex control of sympathetic vasomotor activity and resting arterial pressure at high altitude: insight from Lowlanders and Sherpa. *The Journal of physiology*, 597(9), 2379–2390. <https://doi.org/10.1113/JP277663>

111. Smiley, D. A., & Khalil, R. A. (2009). Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels. *Current medicinal chemistry*, 16(15), 1863–1887. <https://doi.org/10.2174/092986709788186093>

112. Sobrino, A., Oviedo, P. J., Novella, S., Laguna-Fernandez, A., Bueno, C., García-Pérez, M. A., Tarín, J. J., Cano, A., & Hermenegildo, C. (2010). Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- α . *Journal of molecular endocrinology*, 44(4), 237–246. <https://doi.org/10.1677/JME-09-0112>

113. Stenmark, K. R., Davie, N., Frid, M., Gerasimovskaya, E., & Das, M. (2006). Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21, 134–145. <https://doi.org/10.1152/physiol.00053.2005>

114. Stenmark, K. R., Fagan, K. A., & Frid, M. G. (2006). Hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling: cellular and molecular mechanisms. *Circulation research*, 99(7), 675–691. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000243584.45145.3f>

115. Stenmark, K. R., Davie, N., Frid, M., Gerasimovskaya, E., & Das, M. (2006). Role of the adventitia in pulmonary vascular remodeling. *Physiology (Bethesda, Md.)*, 21, 134–145. <https://doi.org/10.1152/physiol.00053.2005>
116. Thomas, B. J., & Wanstall, J. C. (2003). Alterations in pulmonary vascular function in rats exposed to intermittent hypoxia. *European journal of pharmacology*, 477(2), 153–161. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.08.015>
117. Thompson, L. P., Liu, H., Evans, L., & Mong, J. A. (2011). Prenatal nicotine increases matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) expression in fetal guinea pig hearts. *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 18(11), 1103–1110. <https://doi.org/10.1177/1933719111404605>
118. Thompson, J. A., Gros, R., Richardson, B. S., Piorkowska, K., & Regnault, T. R. (2011). Central stiffening in adulthood linked to aberrant aortic remodeling under suboptimal intrauterine conditions. *American journal of physiology. Regulatory, integrative, and comparative physiology*, 301(6), R1731–R1737.
119. Thorneloe, K. S., & Nelson, M. T. (2005). Ion channels in smooth muscle: regulators of intracellular calcium and contractility. *Canadian journal of physiology and pharmacology*, 83(3), 215–242. <https://doi.org/10.1139/y05-016>
120. Torres, F., González-Candia, A., Montt, C., Ebersperger, G., Chubretovic, M., Serón-Ferré, M., Reyes, R. V., Llanos, A. J., & Herrera, E. A. (2015). Melatonin reduces oxidative stress and improves vascular function in pulmonary hypertensive newborn sheep. *Journal of pineal research*, 58(3), 362–373. <https://doi.org/10.1111/jpi.12222>
121. Tremblay, J. C., & Ainslie, P. N. (2021). Global and country-level estimates of human population at high altitude. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 118(18), e2102463118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2102463118>
122. Trillmich, F., Laurien-Kehnen, C., Adrian, A. and Linke, S. (2006), Age at maturity in cavies and guinea-pigs (*Cavia aperea* and *Cavia aperea* f. *porcellus*): influence of social factors. *Journal of Zoology*, 268: 285-294. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2005.00015.x>

123. Tucker WD, Arora Y, Mahajan K. Anatomy, Blood Vessels. [Updated 2023 Aug 8]. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023 Enero-. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470401/>
124. Vassoler, F. M., & Wimmer, M. E. (2021). Consequences of Parental Opioid Exposure on Neurophysiology, Behavior, and Health in the Next Generations. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 11(10), a040436. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a040436>
125. Vickaryous, N., & Whitelaw, E. (2005). The role of early embryonic environment on epigenotype and phenotype. *Reproduction, fertility, and development*, 17(3), 335–340. <https://doi.org/10.1071/rd04133>
126. Wang, J., Chen, H., Seth, A., & McCulloch, C. A. (2003). Mechanical force regulation of myofibroblast differentiation in cardiac fibroblasts. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 285(5), H1871–H1881. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00387.2003>
127. Waterland, R. A., & Garza, C. (1999). Potential mechanisms of metabolic imprinting that lead to chronic disease. *The American journal of clinical nutrition*, 69(2), 179–197. <https://doi.org/10.1093/ajcn/69.2.179>
128. Webb R. C. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, 27(1-4), 201–206. <https://doi.org/10.1152/advan.00025.2003>
129. Yzydorczyk, C., Armengaud, J. B., Peyter, A. C., Chehade, H., Cachat, F., Juvet, C., Siddeek, B., Simoncini, S., Sabatier, F., Dignat-George, F., Mitanchez, D., & Simeoni, U. (2017). Endothelial dysfunction in individuals born after fetal growth restriction: cardiovascular and renal consequences and preventive approaches. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, 8(4), 448–464. <https://doi.org/10.1017/S2040174417000265>
130. Zhuang, J., & Zhou, Z. (1999). Protective effects of intermittent hypoxic adaptation on myocardium and its mechanisms. *Biological signals and receptors*, 8(4-5), 316–322. <https://doi.org/10.1159/000014602>