

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología



**IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS
ALTERACIONES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A
LA PROGRAMACIÓN FETAL DE LA HIPERTENSIÓN
ARTERIAL**

TESIS DOCTORAL

Pilar Rodríguez Rodríguez

2016



Facultad de Medicina
Departamento de Fisiología

Dra. SILVIA M. ARRIBAS RODRIGUEZ, Profesora Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

Dr. ÁNGEL LUIS LÓPEZ DE PABLO LEÓN, Profesor Titular del Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN

Que Dña PILAR RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ ha realizado bajo su dirección el trabajo: "IMPLICACIÓN DEL ESTRÉS OXIDATIVO EN LAS ALTERACIONES CARDIOVASCULARES ASOCIADAS A LA PROGRAMACIÓN FETAL DE LA HIPERTENSIÓN ARTERIAL" con objeto de obtener el Grado de Doctor.

DIRECTORES

Dra. Arribas Rodríguez, Silvia M.

Dr. López de Pablo León, Ángel Luis

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Universidad Autónoma de Madrid. Financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad en su convocatoria del Plan Nacional (FEM2009-13434-C02-02 y FEM2012-37634-C03-01).

A mi familia

A todos

AGRADECIMIENTOS

Gracias a los Dres. Silvia y Ángel Luis, mis directores de tesis, por estos años. Por el apoyo que me habéis dado, por lo que me habéis enseñado, por facilitarme siempre las cosas y por vuestros consejos.

Gracias a M^a Carmen, por estar siempre dispuesta a ayudarme, por tus consejos y por el entusiasmo e ideas aportadas a este trabajo.

Gracias a mis compañeros, Perla, David, Cinthya, José Luis, César, Sara gracias por la energía que me habéis transmitido para afrontar esto. Y gracias a los que me habéis ayudado con “*el último empujón*” de este trabajo.

Gracias a mis chilenas, Karem y Karen por estos meses que hemos compartido juntas.

Gracias Charo, por su amistad y ayuda estadística.

Gracias a todo el Departamento de Fisiología. A Conchi, por facilitarme y ayudarme en las tareas administrativas.

Gracias al Dr. José Juan y a Begoña por su paciencia en el aprendizaje de técnicas ecocardiográficas.

Gracias a la gente del Animalario por su ayuda en el cuidado de los animales.

Gracias al Departamento de Bioquímica por facilitarnos la utilización de sus equipos. Y gracias a Antonio por su amistad.

Gracias al Departamento de Anatomía, Histología & Neurociencia, en concreto al Dr. Regadera, a Carmen y a Juan por su apoyo y ayuda durante estos años.

Gracias a la gente del CEU. Gracias a Beatriz y a Concha por enseñarme tanto. Gracias por hacerme sentir como una más en vuestro laboratorio. Gracias a Marta Gil, Miriam, Danila, Marta, Adrián por tratarme como una más de vuestro grupo.

Gracias a la gente del *Pluri*, Marisol, Gema y Helena por vuestra ayuda. Gracias “*Helena Pluri*” por los momentos de desahogo, por los lloros, por las risas...

Gracias al grupo de investigación en nuevos alimentos del CIAL en especial a M^a Ángeles, Yolanda y Teresa.

Gracias a todos los que fuisteis partícipes de mi experiencia en Oporto. Gracias a José por ayudarme en todo lo que necesité durante mi estancia. Gracias a Inés y a Silvia por vuestro apoyo y ayuda, por vuestra amistad.

Gracias a Carmen Diniz por acogerme en tu laboratorio como una más. Gracias por darme la oportunidad de trabajar en tu grupo y por todo lo que me has enseñado. Gracias a mis compañeras Sofía, Joana, Mónica, Céu por todos los buenos momentos que hemos pasado juntas. Gracias muy especialmente a Sofía por ofrecerme tu casa y tratarme tan bien.

Gracias a mis amigas del Máster, Emma y Rocío por todos estos años juntas, por vuestra amistad y apoyo.

Gracias a mis amigos Raúl, Miriam, Alberto y Elena. Gracias por todo lo que me aguantáis.

Por último, gracias a mi familia, mis padres Benjamín y Pili y mi hermana Beatriz. No sé por dónde empezar. No existen palabras suficientes para agradecer todo lo que habéis hecho por mí. Gracias por estar ahí siempre, por vuestro apoyo. Gracias a vuestro esfuerzo y dedicación he conseguido llegar hasta aquí.

GRACIAS...

ÍNDICE

	Página
Abreviaturas	
RESUMEN	6
ABSTRACT	9
INTRODUCCIÓN	11
1. Enfermedad cardiovascular	12
1.1. Factores de riesgo cardiovascular	12
1.1.1. Factores de riesgo no modificables	13
1.1.2. Factores de riesgo modificables	14
1.2. La hipertensión arterial como FRCV	16
1.2.1. Fisiopatología de la hipertensión esencial	17
1.2.2. Daño cardiaco asociado a HTA	18
2. Programación de la ECV	20
2.1. El estrés fetal como responsable de la programación de ECV	20
2.1.1. Nutrición fetal subóptima	20
2.1.2. Otros factores de estrés fetal	22
2.2. Papel del crecimiento postnatal acelerado en la programación de la ECV	23
2.3. Modelos experimentales para el estudio de la programación fetal	23
2.3.1. Modelos de desnutrición fetal	24
2.4. Mecanismos fisiopatológicos asociados a la programación fetal	24
2.4.1. Alteraciones orgánicas asociadas a la programación fetal	25
2.4.2. Mecanismos implicados en la programación fetal	26
2.4.3. Influencia del sexo en la programación fetal	28
3. Balance oxidativo	29
3.1. Especies reactivas de interés biológico	29
3.1.1. Radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	30
3.1.2. Radical hidroxilo ($\cdot OH$)	30
3.1.3. Radical peroxilo ($ROO\cdot$)	31

3.1.4. Óxido nítrico (NO)	31
3.1.5. Anión peroxinitrito (ONOO ⁻)	31
3.1.6. Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	31
3.2. Sistemas enzimáticos productores de ROS/RNS en el sistema cardiovascular	32
3.2.1. NADPH oxidasas	32
3.2.2. Xantina oxidasa (XO)	33
3.2.3. Mieloperoxidasa (MPO)	33
3.2.4. Sintasa de óxido nítrico (NOS)	33
3.2.5. Otros sistemas enzimáticos	34
3.3. Mecanismos de defensa antioxidante	34
3.3.1. Superóxido dismutasa (SOD)	34
3.3.2. Catalasa	35
3.3.3. Glutación peroxidasa (GPx)	36
3.3.4. Glutación (GSH)	36
3.3.5. Melatonina	37
3.3.6. Coenzima Q10	38
3.3.7. Ácido úrico	38
3.3.8. Antioxidantes de origen exógeno	38
3.4. Biomarcadores de daño oxidativo	39
4. Estrés oxidativo y programación fetal	41
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS / HYPOTHESES AND OBJECTIVES	43
Premisas e hipótesis del estudio	44
Objetivos	44
Basis and hypotheses of the study	47
Objectives	47
MATERIAL Y MÉTODOS	50
1. Modelo experimental	51
2. Diseño experimental	53
3. Métodos experimentales	54
3.1. Procesamiento de muestras de sangre	54
3.2. Determinaciones de hormonas en plasma mediante ELISA	54
3.2.1. Determinación de melatonina en plasma	55

3.3. Medidas corporales	55
3.4. Histología cardiaca	56
3.5. Medida de parámetros hemodinámicos en ratas anestesiadas	57
3.6. Medidas de parámetros de estrés oxidativo en plasma	57
3.6.1. Cuantificación de proteínas totales	57
3.6.2. Cuantificación de proteínas carboniladas	58
3.6.3. Cuantificación de tioles totales	59
3.6.4. Cuantificación de glutatión reducido (GSH)	60
3.6.5. Determinación de la actividad catalasa	61
3.6.6. Determinación de la capacidad antioxidante total. Método TAC	63
3.6.7. Determinación de la actividad SOD mediante el método SOSA	64
3.6.8. Cálculo del parámetro Oxy-score	65
3.7. Estudio de la expresión de proteínas mediante Western Blot	66
3.7.1. Procesamiento de las muestras de tejido cardiaco	66
3.7.2. Detección de proteínas por Western Blot	66
3.8. Estudio ecocardiográfico	69
3.9. Análisis estadístico	70
RESULTADOS	71
1. Parámetros medidos en las ratas gestantes	72
1.1. Peso corporal	72
1.2. Valores plasmáticos de glucosa al final de la lactancia	72
2. Parámetros medidos en las crías	73
2.1. Glucemia	73
2.2. Peso corporal	73
2.3. Longitud de la tibia	74
2.4. Hormonas sexuales	75
2.5. Peso y morfología cardiaca	76
2.6. Parámetros hemodinámicos a los 21 días y 6 meses de edad	78
2.6.1. Presión arterial	78
2.6.2. Frecuencia cardiaca	80
2.7. Estatus oxidativo plasmático a los 21 días y 6 meses de edad	80
2.7.1. Estatus oxidativo en ratas de 21 días de edad	80
2.7.2. Estatus oxidativo en ratas de 6 meses de edad	84
2.8. Expresión de enzimas de estatus oxidativo en corazón a los 21 días de edad	88

2.8.1. Enzimas implicadas en la producción de radicales libres	88
2.8.2. Enzimas implicadas en la eliminación de radicales libres	90
2.9. Expresión de enzimas de estatus oxidativo en corazón a los 6 meses de edad	92
2.9.1. Enzimas implicadas en la producción de radicales libres	92
2.9.2. Enzimas implicadas en la eliminación de radicales libres	94
2.10. Ecocardiografía transtorácica a los 6 meses de edad	97
2.10.1. Diámetros telediastólico y telesistólico	97
2.10.2. Grosor del septo interventricular, grosor de la pared posterior y masa del ventrículo izquierdo	98
2.10.3. Fracción de eyección	100
DISCUSIÓN	101
1. Modelo de programación fetal	102
2. Desarrollo de hipertensión	104
3. Alteraciones en el estatus oxidativo global	105
4. Alteraciones cardiacas	111
CONCLUSIONES	116
CONCLUSIONS	118
BIBLIOGRAFÍA	119
ANEXOS. Publicaciones derivadas de esta tesis doctoral	140

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema sobre las reacciones de formación y eliminación de ROS y los sistemas de defensa antioxidante	39
Figura 2. Modelo experimental de restricción nutricional durante la gestación	52
Figura 3. Principio básico de la técnica de ELISA competitivo	55
Figura 4. Resumen de la técnica de procesado de tejidos	56
Figura 5. Esquema de la medida directa de la onda de presión arterial en la rata anestesiada	57
Figura 6. Esquema de la reacción entre grupos carbonilos proteicos y la DNPH	58
Figura 7. Reacción entre grupos tioles y DTNB	59
Figura 8. Esquema de la reacción entre GSH y OPT	60
Figura 9. Esquema de las reacciones implicadas en la determinación de la actividad catalasa mediante la oxidación del Amplex Red	62
Figura 10. Fundamento del método TAC de inhibición de la luminiscencia	63
Figura 11. Esquema del mecanismo en el que se basa el método SOSA	64
Figura 12. Glucemia en ratas Control y MUN a distintas edades	73
Figura 13. Niveles de estradiol en plasma en ratas Control y MUN a los 21 días de edad	75
Figura 14. Niveles de testosterona en plasma en ratas Control y MUN a los 21 días de edad	76
Figura 15. Área muscular ventricular a los 21 días de edad	78
Figura 16. Presión arterial sistólica y diastólica en ratas MUN y Control a distintas edades	79
Figura 17. Actividad SOD y catalasa en ratas MUN y control a los 21 días de edad	81
Figura 18. Niveles de GSH y tioles a los 21 días de edad en ratas MUN y control	82
Figura 19. Niveles de melatonina a los 36 días de edad en ratas MUN y control	83
Figura 20. Niveles de carbonilos a los 21 días de edad en ratas MUN y control	83
Figura 21. Oxy-score a los 21 días de edad en ratas MUN y control	84
Figura 22. Actividad SOD y catalasa en ratas MUN y control a los 6 meses de edad	85
Figura 23. GSH y tioles en ratas MUN y control a los 6 meses de edad	86

Figura 24. Carbonilos totales en ratas MUN y control a los 6 meses de edad	87
Figura 25. Oxy-score a los 6 meses de edad en ratas MUN y control	87
Figura 26. Expresión de las subunidades p22 ^{phox} y p47 ^{phox} de la NADPH oxidasa en ratas control y MUN a los 21 días de edad	89
Figura 27. Expresión de xantina oxidasa en ratas control y MUN a los 21 días de edad	90
Figura 28. Expresión de las distintas isoformas de SOD en ratas MUN y control a los 21 días de edad	91
Figura 29. Expresión de catalasa en ratas MUN y control a los 21 días de edad	92
Figura 30. Expresión de las subunidades p22 ^{phox} y p47 ^{phox} de la NADPH oxidasa en ratas control y MUN a los 6 meses de edad	93
Figura 31. Expresión de xantina oxidasa en ratas control y MUN a los 6 meses de edad	94
Figura 32. Expresión de las distintas isoformas de SOD en ratas MUN y control a los 6 meses de edad	95
Figura 33. Expresión de catalasa en ratas MUN y control a los 21 días de edad	96
Figura 34. Diámetro telediastólico y telesistólico del ventrículo izquierdo en ratas MUN y control de 6 meses de edad	97
Figura 35. Grosor del septo, grosor de la pared posterior y masa del ventrículo izquierdo en ratas MUN y control a los 6 meses de edad	99
Figura 36. Fracción de eyección en ratas MUN y control a los 6 meses de edad	100

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Determinaciones llevadas a cabo en la descendencia de ratas MUN y control	53
Tabla 2. Incremento de peso durante la gestación y valores plasmáticos de glucosa al final de la lactancia	72
Tabla 3. Peso corporal a distintas edades en ratas Control y MUN	74
Tabla 4. Longitud de la tibia a distintas edades en ratas Control y MUN	75
Tabla 5. Peso corazón/peso corporal a distintas edades en ratas Control y MUN	77
Tabla 6. Peso corazón/longitud de la tibia a distintas edades en ratas Control y MUN	77
Tabla 7. Frecuencia cardiaca a distintas edades en ratas Control y MUN	80

ABREVIATURAS

ANOVA: Análisis de la varianza

ATP: Adenosín trifosfato

BH4: Tetrahidrobiopterina

BSA: Albúmina sérica bovina

C: Control

CML: Células musculares lisas

CO₂: Dióxido de carbono

CoA: Coenzima A

CTZ: Coelenterazina

CTA: Coelenteramida

Cu/Zn-SOD: Isoforma citosólica de la superóxido dismutasa

DdVI: Diámetro interno del ventrículo izquierdo al final de la diástole

DNPH: Dinitrofenilhidrazina

DsVI: Diámetro interno del ventrículo izquierdo al final de la sístole

EC-SOD: Isoforma extracelular de la superóxido dismutasa

ECV: Enfermedad cardiovascular

ELISA: Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay

ETT: Ecocardiografía transtorácica

FC: Frecuencia cardiaca

FRCV: Factor de riesgo cardiovascular

GADPH: Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa

GPx: Glutación peroxidasa

GR: Glutathion reductasa

GSH: Glutation reducido

GSSG: Glutation oxidado

HDL: High density lipoproteins

HRP: Horseradish peroxidase enzyme

11 β -HSD: 11 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa

HTA: Hipertensión arterial

HVI: Hipertrofia ventricular izquierda

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

IGF: Insulin-like growth factor

IMC: Índice de masa corporal

L-arg: L-arginina

LDL: Low density lipoproteins

LGF: *Liver Growth Factor*

L-NAME: N^G-nitro-L-arginina-metilester

LOOH: Hidroperóxidos lipídicos

Mn-SOD: Isoforma mitocondrial de la superóxido dismutasa

MMP: Metaloproteinasa

MPO: Mieloperoxidasa

MUN: Maternal Undernutrition

MVI: Masa del ventrículo izquierdo

NADH: Dinucleótido reducido de nicotinamida y adenina

NADPH: Dinucleótido fosfato reducido de nicotinamida y adenina

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

O₂^{•-}: Anión superóxido

•OH: Radical hidroxilo

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONOO^{•-}: Radical peroxinitrito

OPT: O-ftalaldehido

PAD: Presión arterial diastólica

PAS: Presión arterial sistólica

PBS: Tampón fosfato salino

PBS-T: Tampón fosfato salino- Tween

PFA: Paraformaldehido

PPd: Pared posterior del ventrículo izquierdo

RIU: Retraso intrauterino

RL: Radicales libres

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROO[•]: Radical peroxilo

ROS: Reactive Oxygen Species

SD: Sprague Dawley

SDS: Dodecil sulfato sódico

SIVd: Septo interventricular

SOD: Superóxido dismutasa

SRA: Sistema renina angiotensina

TAC: Total Antioxidant Capacity

TBARS: Thiobarbituric acid-reactive substance

TEMED: Tetrametiletilenodiamina

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

VD: Volumen telediastólico ventricular izquierdo

VI: Ventrículo izquierdo

VS: Volumen sistólico ventricular izquierdo

WB: *Western Blot*

XDH₂: Xantina deshidrogenasa

XO: Xantina oxidasa

RESUMEN

Abstract

Resumen

Estudios epidemiológicos demuestran que un bajo peso al nacer, inducido por inadecuado aporte de nutrientes al feto u otros factores estresores durante la vida intrauterina, se asocia con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares (ECV) en la edad adulta y, particularmente, con alteraciones cardíacas. Este fenómeno se ha denominado programación fetal de la ECV. Así mismo, se ha constatado que un bajo peso al nacer también está asociado a diversos factores de riesgo de ECV, siendo la hipertensión arterial el más frecuente. Las observaciones epidemiológicas han sido corroboradas en modelos animales en los que se reduce el aporte de nutrientes al feto, los cuales también presentan, entre otras alteraciones, hipertensión y remodelado cardíaco en la edad adulta. Los mecanismos responsables de la asociación entre desnutrición durante la etapa intrauterina, el bajo peso al nacer y programación de la ECV aún no han sido completamente dilucidados, postulándose entre otros, la implicación del estrés oxidativo. La hipertensión asociada a la programación fetal parece tener menor impacto en mujeres, lo que ha sido corroborado en animales de experimentación. Este hecho se ha relacionado con el papel protector de los estrógenos, no habiéndose evaluado si existen otros mecanismos anteriores al desarrollo sexual, ni el impacto sobre el corazón. Se postula la **hipótesis** de que una nutrición fetal subóptima produce alteraciones tempranas en el balance oxidativo que pueden contribuir al desarrollo de hipertensión y explicar las diferencias entre sexos. También se postula que un mejor balance oxidativo puede proteger a las hembras del desarrollo de alteraciones cardíacas. El **objetivo** de esta Tesis ha sido evaluar, en un modelo de programación fetal en la rata: 1) si existen alteraciones sexo-dependientes en los niveles plasmáticos de antioxidantes y daño oxidativo en la etapa pre-puberal y en la edad adulta y su relación con el desarrollo de hipertensión y 2) la relación entre los sistemas enzimáticos responsables del balance oxidativo en tejido cardíaco y el desarrollo de hipertrofia ventricular, evaluando las diferencias entre sexos. Este estudio se llevó a cabo en un modelo experimental de programación fetal en ratas *Sprague Dawley* inducido por restricción al 50% de la ingesta materna durante la segunda mitad de la gestación (Maternal Undernutrition, MUN) utilizando como control ratas alimentadas *ad libitum*. En la descendencia,

machos y hembras, se analizaron los siguientes aspectos: 1) parámetros de crecimiento, a los 7 días, 21 días y 6 meses de edad; 2) presión arterial en la rata anestesiada, evaluada mediante medida intra-arterial a los 21 días y 6 meses de edad; 3) determinaciones plasmáticas, a los 21 días y 6 meses de edad, de los siguientes biomarcadores: carbonilos, tioles, y glutatión (métodos espectrofotométricos), capacidad antioxidante total (TAC) y actividad superóxido dismutasa (SOD) (luminómetro), actividad catalasa (fluorescencia) y cálculo de un índice global de estado oxidativo plasmático (Oxy-Score) utilizando estos biomarcadores; 4) determinación de melatonina, estrógenos y testosterona a los 21 días de edad (ELISA); 5) expresión en tejido cardíaco de enzimas responsables de la síntesis (NADPH y xantina oxidasa) y eliminación (SODs y catalasa) de radicales libres de oxígeno, ROS, (western-blot); 6) histología cardíaca (secciones en parafina y tinción con PAS) a los 21 días y 7) ecocardiografía transtorácica a los 6 meses de edad. Los **resultados** muestran que la restricción de nutrientes al feto produce: 1) bajo peso al nacer seguido de crecimiento postnatal acelerado (*catch-up growth*), sin efectos sobre el desarrollo puberal, tanto en machos como en hembras; 2) hipertensión en machos en la edad adulta, que no se desarrolla en hembras; 3) un estado pro-oxidativo plasmático global en machos, pero no en hembras, por deficiencia generalizada de antioxidantes al destete, que se normaliza en la edad adulta, 4) bajos niveles de melatonina en machos pero no en hembras, 5) hipertrofia ventricular en machos, asociada a niveles altos de NADPH oxidasa a los 21 días, seguida de una hipotrofia ventricular a los 6 meses, 6) tendencia a hipertrofia ventricular en hembras en la edad adulta, asociada con baja expresión de SODs y catalasa. En **conclusión**, las hembras sometidas a desnutrición fetal: 1) tienen una mayor capacidad antioxidante global en edades tempranas, lo que puede contribuir a su protección frente al desarrollo de hipertensión; 2) presentan un desarrollo más tardío de la hipertrofia ventricular izquierda, asociada con diferencias en el patrón de expresión de las enzimas relacionadas con la síntesis y eliminación de ROS.

Abstract

Epidemiological studies show that low birth weight, induced by inadequate supply of nutrients to the fetus or other stress factors during intrauterine life, is associated with the development of cardiovascular disease (CVD) in adulthood and particularly with cardiac abnormalities. This phenomenon is known as fetal programming of CVD. It has also been found that low birth weight is associated with several CVD risk factors, being hypertension the most frequent one. Epidemiological studies have been confirmed in animal models in which nutrient supply to the fetus is reduced. These animals also present, among other alterations, hypertension and cardiac remodeling in adulthood. The mechanisms responsible for the association between undernutrition during fetal life, low birth weight and CVD have not yet been fully elucidated, postulating among others, the implication of oxidative stress. Hypertension associated with fetal programming seems to have less impact on women, which has been confirmed in experimental animals. This fact has been linked to the protective role of estrogen and other possible mechanisms, independent of sex hormones, have not been evaluated. In addition, the impact of fetal programming on female heart has not been explored. The **hypothesis** of this Thesis is that sub-optimal fetal nutrition produces early alterations in oxidative balance that can contribute to the development of hypertension and may explain gender differences. It is also postulated that a better oxidative balance can protect females from development of cardiac abnormalities. The **aim** of this Thesis was to evaluate, in a model of fetal programming in the rat: 1) if there are sex-dependent differences in plasma antioxidants and oxidative damage in the pre-puberal and in adult age and their relationship with hypertension development and 2) the relationship between the enzymes responsible for oxidative balance in cardiac tissue and the development of ventricular hypertrophy, evaluating sex differences. This study was conducted in an experimental model of fetal programming in Sprague Dawley rats induced by 50% restriction of maternal intake during the second half of pregnancy (Maternal Undernutrition, MUN) using as control, rats fed *ad libitum*. In male and female offspring the following aspects were analyzed: 1) growth parameters, at the ages of 7 days, 21 days and 6 months; 2) blood pressure, assessed by intra-arterial measurements in

anesthetized rats at the age of 21 days and 6 months; 3) plasma determinations, in 21 day and 6 month old rats, of the following biomarkers: carbonyls, thiols, and glutathione (spectrophotometric methods), total antioxidant capacity (TAC) and superoxide dismutase (SOD) activity (luminometer), catalase activity (fluorescence) and the calculation of an overall score of plasma oxidative status (Oxy-Score) from this biomarkers; 4) determination of melatonin, estrogen and testosterone at 21 days of age (ELISA); 5) cardiac tissue expression (western-blot) of the enzymes responsible for reactive oxygen species (ROS) synthesis (NADPH and xanthine oxidases) and elimination (SODs and catalase); 6) cardiac histology (paraffin sections and PAS staining) in 21 day-old rats and 7) transthoracic echocardiography in 6 month-old rats. The **results** show that fetal nutrient restriction induces: 1) low birth weight followed by rapid postnatal growth with no effects on puberal development, both in males and females; 2) hypertension development in males in adult age, which is not developed in females; 3) a global plasma pro-oxidative status in males, but not in females, due to a generalized deficiency of antioxidants at weaning, which normalized in adulthood; 4) low levels of melatonin in males, but not in females; 5) ventricular hypertrophy in males, associated with high levels of NADPH oxidase at the age of 21 days, followed by a ventricular hypotrophy at 6 months; 6) tendency to develop ventricular hypertrophy in females in adult age, associated with low expression of SODs and catalase. In **conclusion**, females exposed to fetal undernutrition exhibit: 1) a better overall antioxidant capacity at an early age than males, which may contribute to their protection against hypertension development; 2) a later development of left ventricular hypertrophy, associated with different expression pattern of the enzymes responsible for ROS synthesis and degradation.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad cardiovascular

Las enfermedades no transmisibles o crónicas son aquellas que tienen una larga duración, una progresión generalmente lenta y no se transmiten de persona a persona. Entre las más importantes están las enfermedades cardiovasculares (ECV), junto con el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas y la diabetes.

Las enfermedades no transmisibles han superado a las enfermedades infecciosas como principales causas de enfermedad en el mundo, afectando a todos los países, sobre todo a aquellos de ingresos bajos y medios. Aunque estas enfermedades se asocian usualmente al envejecimiento, afectan a todos los grupos de edad y se ven favorecidas por estilos de vida poco saludables.

Las ECV son aquellas que afectan al sistema circulatorio, siendo las más importantes el infarto de miocardio, la insuficiencia cardíaca, los accidentes cerebrovasculares y la enfermedad vascular periférica. Las ECV son responsables de la mayoría de las muertes producidas por enfermedades no transmisibles, unos 17 millones al año, lo que significa casi un tercio del total.

1.1. Factores de riesgo cardiovascular

Un factor de riesgo cardiovascular (FRCV) se puede definir como una característica biológica o un hábito o estilo de vida que aumenta la probabilidad de padecer una ECV o de morir a causa de ella.

Los FRCV pueden ser clasificados de varias maneras; una de las más habituales es, en modificables y no modificables. Los FRCV no modificables son aquellos propios del individuo, y por lo tanto no es posible revertirlos o eliminarlos; incluyen el sexo, la edad y la herencia. Por otro lado, los FRCV modificables pueden ser corregidos o eliminados mediante cambios en el estilo de vida o intervenciones terapéuticas. Entre los más importantes se encuentran la hipertensión arterial (HTA), la hipercolesterolemia, la obesidad, la Diabetes Mellitus tipo II, así como hábitos y estilo de vida inadecuados como el tabaquismo, el sedentarismo, el estrés y un consumo excesivo de alcohol (Everson-Rose, Lewis 2005, Beilin, Puddey 2006).

La probabilidad de que un individuo padezca una ECV es tanto mayor cuanto más FRCV acumule, por lo cual es deseable el control del máximo número de factores posibles, mediante cambios en el estilo de vida o tratamientos.

A continuación se describen brevemente los FRCV más importantes, indicando los aspectos epidemiológicos relativos a la población española. Se describe con mayor detalle, en otro apartado la hipertensión arterial, al ser uno de los factores de riesgo con mayor impacto.

1.1.1. Factores de riesgo no modificables

Sexo. Se ha demostrado que, en general, los hombres tienen mayor riesgo de padecer ECV que las mujeres en edad fértil; pero el riesgo es similar a partir de la menopausia. Este hecho se ha relacionado con el papel protector de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular (Yamatani et al. 2015). No obstante, además de las hormonas sexuales pueden existir otros factores relacionados con el sexo que también influyan sobre el desarrollo de ECV.

Edad. El riesgo cardiovascular aumenta con la edad, habiéndose demostrado que aproximadamente 4 de cada 5 muertes debidas a ECV se producen en personas mayores de 65 años. Esto se debe al deterioro del sistema cardiovascular a lo largo de la vida, que conlleva a alteraciones en la función y estructura del corazón y los vasos, resultando en una disminución de la eficiencia del corazón para bombear la sangre y aumento de la rigidez vascular (McEniery et al. 2007).

Aspectos genéticos. Las ECV pueden tener un componente hereditario, habiéndose demostrado que individuos cuyos padres o hermanos padecieron un problema cardíaco o circulatorio antes de los 55 años de edad tienen un mayor riesgo cardiovascular. Además, factores de riesgo tales como la hipertensión, la diabetes y la obesidad también pueden transmitirse de una generación a la siguiente (Puzyrev 2015). La raza también influye en la presión arterial; presentando los individuos de raza negra valores superiores a los de raza blanca (Burt et al. 1995).

1.1.2. Factores de riesgo modificables.

Hipercolesterolemia. El colesterol sérico total es el factor de riesgo coronario más importante. La concentración normal de colesterol en plasma, en individuos sanos, es de 120 a 200 mg/dL. Además del colesterol total hay que tener en cuenta los valores de colesterol sérico unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL, Low Density Lipoprotein; <120 mg/dL) y de alta densidad (HDL, High Density Lipoprotein; >60 mg/dL).

Ha sido descrito que un nivel elevado de LDL es la principal causa de ECV por contribuir a la formación de la placa de ateroma. Por otro lado, el colesterol ligado a HDL es considerado un factor protector de la aterosclerosis.

Aproximadamente la mitad de la población adulta española tiene hipercolesterolemia aunque un elevado porcentaje lo desconoce, ya que existe un control escaso de los niveles de colesterol sérico (Guallar-Castillón et al. 2012). Hay que destacar que la dieta y la actividad física, pueden ayudar a normalizar los niveles de colesterol o la relación LDL/HDL, reduciendo la necesidad de fármacos (Guallar-Castillón et al. 2012).

Obesidad y sobrepeso. El exceso de peso es, en sí mismo, un FRCV y además puede favorecer otros factores de riesgo; por ejemplo puede elevar el colesterol, la presión arterial y contribuir al desarrollo de diabetes. Se considera que un individuo tiene sobrepeso cuando su índice de masa corporal (IMC) es de 25-29.9 kg/m² y se habla de obesidad cuando el IMC supera los 30 kg/m².

El sobrepeso y la obesidad constituyen una epidemia mundial y están en aumento en España, siendo la prevalencia de sobrepeso de un 39.4% y la de obesidad de un 22.9%. La mortalidad debida al exceso de peso es uno de los mayores problemas de salud pública en España y constituye dos tercios de las muertes debidas a ECV (Gutiérrez-Fisac et al. 2012). También se ha constatado que la frecuencia de obesidad disminuye al aumentar el nivel de educación e ingresos de la población, probablemente relacionado con una mejora de la nutrición.

Diabetes Mellitus tipo II. La diabetes conlleva un importante riesgo de ECV, tanto por sí misma como por su asociación a otros factores de riesgo, como hipertensión arterial y dislipemia. Los pacientes con diabetes tipo II presentan

niveles elevados de glucosa en sangre (mayores de 110 mg/dL) y frecuentemente se asocia con resistencia a la insulina. Estas alteraciones conducen al deterioro del sistema cardiovascular entre otros. De hecho, diversos estudios indican que la diabetes es responsable de un 6% de las muertes por ECV en España, porcentaje que va en aumento (Banegas et al. 2003).

Hábitos y estilos de vida. Numerosos estudios demuestran que la ECV también se asocia con hábitos dietéticos y estilos de vida inadecuados. Entre otros, cabe destacar el tabaquismo, el sedentarismo, el estrés y el consumo excesivo de sal o alcohol.

El consumo de tabaco eleva la frecuencia cardíaca, aumenta la rigidez arterial y puede causar irregularidades del ritmo cardíaco. Todos estos factores hacen que aumente el trabajo cardíaco. Además, el tabaquismo eleva la presión arterial, que es otro importante FRCV. A pesar de las medidas adoptadas por el Ministerio de Sanidad en 2011, la prevalencia de fumadores en España es actualmente de un 27%. Alrededor de un 16% de las muertes por enfermedad cardiovascular se atribuyen al consumo de tabaco en adultos, siendo un importante porcentaje de estas muertes atribuibles a enfermedad coronaria y accidente cerebrovascular (Banegas et al. 2003).

El sedentarismo también constituye un FRCV, habiéndose constatado que las personas inactivas tienen mayor riesgo de sufrir ECV que las personas que hacen ejercicio de manera regular. Entre otras razones, esto se debe a que la actividad física regular controla los niveles de colesterol, la glucemia y mejora la función vascular y cardíaca (Blair 2009).

El estrés psicológico es otro factor que contribuye al riesgo cardiovascular. Entre otras razones las situaciones estresantes aumentan la frecuencia cardíaca y la presión arterial, en parte debido a la liberación de hormonas, principalmente la adrenalina, que hace que aumente la presión arterial, otro FRCV. Asimismo, el estrés también aumenta la concentración de factores de coagulación en la sangre, elevando así el riesgo de que se formen trombos (Campo et al. 2006).

Un consumo excesivo de alcohol también es considerado un FRCV, habiendo sido relacionado con problemas cardíacos, tales como arritmias y cardiomiopatías, así como con accidentes cerebrovasculares e hipertensión (Beilin, Puddey 2006).

Finalmente, un consumo excesivo de sal también repercute negativamente por elevar los niveles de presión arterial, que es uno de los FRCV con mayor impacto en la salud cardiovascular.

1.2. La hipertensión arterial como FRCV

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se considera que una persona es hipertensa cuando tiene una presión arterial sistólica (PAS) igual o superior a 140 mmHg y una presión arterial diastólica (PAD) igual o superior a 90 mmHg. En 2003, la European Society of Hypertension y la American Hypertension Society establecieron la clasificación de los distintos grados de hipertensión (Chobanian et al. 2003). Dada la importancia de la hipertensión como FRCV, estas Sociedades se reúnen periódicamente para revisar los valores óptimos de presión arterial y establecer los criterios de tratamiento, según estén presentes o no otros FRCV adicionales (James et al. 2014).

La hipertensión arterial puede clasificarse en hipertensión primaria o esencial e hipertensión secundaria. La hipertensión esencial tiene un origen desconocido multifactorial y es el tipo de hipertensión más común en la población, presentándose en aproximadamente un 95% de los pacientes. La hipertensión secundaria tiene una etiología conocida, ocurre en el 5-10% de los pacientes hipertensos y generalmente resulta de alteraciones de las arterias renales, estrechamiento de la arteria aorta, tumores de origen endocrino o efectos iatrogénicos. Una vez conocida la causa de la hipertensión y, realizando la intervención terapéutica necesaria, la presión arterial retorna a sus valores normales (Mansia et al. 2007).

En España, la HTA constituye un importante problema de salud pública; su prevalencia es de aproximadamente un 35%, llegando al 40% a mediana edad y a más del 60% en los mayores de 60 años, afectando en total a unos 10 millones de individuos adultos. Aproximadamente un 25% del total de muertes

y un 43% de las causadas por ECV se atribuyen a la hipertensión esencial (Banegas 2005).

La prevalencia de la HTA en España, como en otros países, parece haber variado poco en las últimas décadas, aunque en los últimos años se está observando un aumento que podría estar relacionado con el envejecimiento de la población y con la epidemia actual de obesidad (Banegas 2005).

La HTA suele presentarse asociada a otros FRCV como la obesidad, la diabetes y la hipercolesterolemia, lo que se denomina síndrome cardiometabólico (Wassink et al. 2007). Esta asociación aumenta el riesgo de desarrollo de ECV.

1.2.1. Fisiopatología de la hipertensión esencial

Aunque la hipertensión esencial tiene un origen desconocido, puede ser atribuida a múltiples factores. A continuación se describen algunas de las alteraciones orgánicas -remodelado vascular y disfunción endotelial- y posibles mecanismos implicados en su patogénesis, en particular el papel de la angiotensina II y estrés oxidativo.

Remodelado vascular. Una de las características principales de la hipertensión esencial es el aumento de la resistencia periférica, que se ha descrito tanto en pacientes con HTA como en modelos experimentales de hipertensión. Este incremento de la resistencia periférica es debido principalmente a un estrechamiento general de los vasos pequeños, lo que se conoce como remodelado vascular (Intengan, Schiffrin 2000, Mulvany 2003, Bund, Lee 2003, Condezo-Hoyos et al. 2012). Esta alteración no sólo perpetúa la HTA sino que se ha demostrado que participa en el desarrollo de ECV (Mathiassen et al. 2007, Rizzoni et al. 2003).

Disfunción endotelial. Es bien conocido que la HTA también se asocia con disfunción endotelial. Esta se caracteriza por una disminución en la relajación dependiente de endotelio por exceso de agentes vasoconstrictores o por disminución de vasodilatadores (Lahera et al. 2003). A su vez, una deficiencia de factores dilatadores como el óxido nítrico (NO), el factor hiperpolarizante dependiente de endotelio (EDHF) y la prostaglandina (PGI), puede ser debida a

una deficiencia en la síntesis o a un aumento en su degradación, jugando un papel relevante el estrés oxidativo.

La disfunción endotelial y el estrés oxidativo no sólo son característicos de la HTA sino que también se asocian a otros FRCV incluyendo modificables y no modificables (Husain et al. 2015).

Papel del sistema renina-angiotensina (SRA) y estrés oxidativo. Diversos estudios han demostrado que alteraciones del SRA juegan un papel importante en la fisiopatología de la HTA, a través de la angiotensina II, la cual participa en los procesos de remodelado, fibrosis y disfunción endotelial (Montezano et al. 2014). Por un lado, la angiotensina II modifica la regulación de la homeostasis hidrosalina a través de la liberación de aldosterona. Así mismo, este péptido produce contracción del músculo liso vascular y potencia la liberación de otros vasoconstrictores como la noradrenalina, la vasopresina y la endotelina. Además, la angiotensina II está implicada en alteraciones del balance oxidativo estimulando la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en tejido vascular y cardíaco (Montezano et al. 2014). A su vez, un exceso de ROS, que supere a la capacidad de eliminación por los sistemas de defensa antioxidante del organismo, conduce a una situación de desequilibrio -denominado estrés oxidativo- que produce oxidación excesiva de macromoléculas dañando estructuras cardiovasculares y alterando los procesos de crecimiento y muerte celular, producción de matriz extracelular y degradación de factores vasodilatadores como el NO (Briones, Touyz 2010). El estrés oxidativo, mediado por angiotensina II o por otras causas, como fenómenos inflamatorios o estiramiento de la pared vascular, contribuye al desarrollo de las alteraciones funcionales y estructurales del sistema cardiovascular y es uno de los mecanismos implicados en la patología de la HTA.

1.2.2. Daño cardíaco asociado a HTA

La hipertensión mantenida a lo largo del tiempo, deteriora el corazón. El sustrato anatómico y fisiopatológico fundamental de la afectación cardíaca en la HTA es la hipertrofia ventricular izquierda (HVI) que, a largo plazo, puede llevar a una insuficiencia cardíaca. La HVI puede definirse como un aumento de la masa del ventrículo izquierdo indexada por el peso corporal, que se conoce

como el índice de masa cardíaca, siendo normal hasta 125 g/m^2 (Duguay et al. 2007, Morales et al. 1999). La HVI surge como un mecanismo fisiológico de adaptación del ventrículo izquierdo al exceso de presión en el sistema arterial. Sin embargo, a largo plazo, esta hipertrofia es deletérea ya que se acompaña de aumento de la cantidad de colágeno intersticial, lo que produce rigidez, dificultando el llenado del corazón y comprometiendo la irrigación del músculo miocárdico. Así, la HVI no se manifiesta clínicamente en sus inicios, pero si progresa, favorece la aparición de eventos cardiovasculares adversos, como la cardiopatía isquémica, la insuficiencia cardíaca y las arritmias.

En la población española la prevalencia de la HVI es de un 10-20% en personas menores de 55 años, aumentando hasta un 60% en mayores de 60 años (Ruilope, Schmieder 2008).

En la clínica, la valoración de la presencia de HVI se realiza mediante ecocardiografía. Esta prueba diagnóstica permite determinar diversos parámetros como la masa ventricular izquierda, la pared del septo interventricular, el grosor de la pared posterior del ventrículo y los diámetros telediastólico y telesistólico. Así mismo, mediante ecocardiografía también se puede determinar la función ventricular calculando la fracción de eyección. En relación a la HVI asociada a la HTA se han descrito cuatro tipos de alteraciones morfológicas del ventrículo izquierdo (Alonso, Montero 2004).

2. Programación de la ECV

En las dos últimas décadas se ha puesto de manifiesto la importancia de la vida fetal y postnatal temprana sobre la salud cardiovascular en etapas posteriores de la vida.

Los primeros estudios epidemiológicos y de cohorte fueron realizados en Inglaterra y Escandinavia, en los que se demostró la estrecha asociación entre un bajo peso al nacer y el desarrollo posterior de enfermedades crónicas, particularmente la ECV (Forsdahl 1977, Barker, Osmond 1986).

Esto condujo a postular la hipótesis de la programación fetal de la ECV, o Hipótesis de Barker, que se define como el proceso mediante el cual ciertas condiciones adversas durante la vida intrauterina incrementan la susceptibilidad de padecer enfermedades no transmisibles en la edad adulta.

Esta hipótesis ha sido corroborada por numerosos estudios que han constatado la asociación entre un bajo peso al nacer y un mayor riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares y metabólicas, así como sus factores de riesgo (Barker, Clark 1997, Hanson, Gluckman 2008, Nuyt 2008, Poston 2011, Lakshmy 2013). El bajo peso al nacer puede ser debido a nacimiento prematuro o a crecimiento fetal adverso -por malnutrición materna o por retraso intrauterino (RIU)-.

2.1. El estrés fetal como responsable de la programación de ECV

La etapa intrauterina es una etapa de crecimiento con gran plasticidad en la que el feto es especialmente susceptible a las influencias del medio que le rodea. Cuando el feto se ve sometido a una situación estresante, como una inadecuada nutrición o la exposición a sustancias que puedan influir en el desarrollo, éste se adapta y sobrevive. Sin embargo, los cambios orgánicos que se producen a largo plazo pueden ser deletéreos.

2.1.1. Nutrición fetal subóptima

Uno de los factores de estrés intrauterino mejor conocidos es un inadecuado aporte de nutrientes al feto, que puede ser originado por una desnutrición materna o por una inadecuada placentación.

Nutrición materna. Se ha demostrado que una inadecuada nutrición durante toda o una parte de la etapa gestacional, aumenta la probabilidad de desarrollo de enfermedades no transmisibles en la descendencia y, en concreto, de enfermedades metabólicas y ECV. Muchos de los estudios que han demostrado la asociación entre bajo peso al nacer y desarrollo posterior de enfermedades cardiometabólicas se han llevado a cabo en los descendientes de mujeres que habían sufrido malnutrición en la gestación, durante las hambrunas de la 2º Guerra Mundial (Roseboom et al. 2000, Painter et al. 2005, Ravelli et al. 1999). Estos estudios han demostrado que la desnutrición en la etapa fetal se asocia con mayores niveles de presión arterial y riesgo de enfermedad coronaria en la edad adulta. Estudios epidemiológicos posteriores llevados a cabo en otras regiones geográficas, como India (Stein et al. 1996) y Biafra (Hult et al. 2010) han corroborado la Hipótesis de Barker, la cual está ampliamente admitida hoy en día, habiendo sido objeto de numerosas revisiones (Barker, Clark 1997, Hanson, Gluckman 2008, Nuyt 2008, Poston 2011, Lakshmy 2013). Así mismo esta hipótesis ha sido corroborada por numerosos estudios en animales de experimentación.

Disfunción de la placenta. La placenta es un órgano fundamental durante la gestación que participa en el transporte de nutrientes, en la respuesta inmunológica, en la síntesis de hormonas y en la detoxificación de sustancias nocivas para el feto. Por ello, una alteración o función deficiente de la placenta puede dar lugar a alteraciones en el desarrollo fetal, como el retraso intrauterino (RIU) (Fowden et al. 2008). Se ha demostrado que una insuficiencia en el aporte de nutrientes al feto a través de la placenta, también se asocia con bajo peso al nacer y desarrollo de ECV en la edad adulta (Godfrey 2002).

Es importante destacar que en España y otros países de nuestro entorno socioeconómico, aunque la probabilidad de desnutrición materna es baja, la insuficiencia placentaria, el RIU y la prematuridad están en aumento por el retraso en la maternidad; con el consiguiente aumento del riesgo de programación fetal.

2.1.2. Otros factores de estrés fetal

Además de un aporte insuficiente de nutrientes, la exposición del feto a hipoxia, sustancias tóxicas o que modifican el desarrollo fetal, también programan al individuo para desarrollar ECV.

Exposición a tóxicos. El tabaquismo es un factor importante que afecta no sólo la reproducción y el proceso de embarazo, sino también a la descendencia. Se ha constatado que la exposición al humo del tabaco y la nicotina -ya sea pasiva o activa- acorta el tiempo de embarazo, el peso del recién nacido y la placenta. También se ha demostrado que la exposición al humo de tabaco durante el periodo periconcepcional, puede producir alteraciones congénitas cardíacas (Forest, Priest 2016). El consumo de alcohol durante el periodo gestacional también se ha relacionado con un bajo peso al nacer y por lo tanto con la programación fetal de la enfermedad cardiovascular (Alexander et al. 2015). Tanto el tabaquismo como el consumo de alcohol, además de un efecto directo sobre el crecimiento fetal, podrían causar hipoxia en el útero. Se ha demostrado que la hipoxia fetal es otro factor que también se asocia con desarrollo de ECV (Zhang 2005). Estos datos en humanos han sido corroborados en modelos experimentales en rata (Zhu et al. 2016).

Exposición a glucocorticoides. La exposición del feto a un exceso de glucocorticoides puede limitar el crecimiento fetal y programar el sistema cardiovascular, el endocrino y el metabólico (Bertram, Hanson 2002). Normalmente, los niveles de glucocorticoides del feto son mucho más bajos que los niveles maternos, debido a la barrera placentaria formada por la 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 β -HSD), enzima que regula el acceso de cortisol al feto (Cottrell et al. 2014).

En humanos se ha observado que las mutaciones del gen la11 β -HSD causan bajo peso al nacer y que una reducción de la actividad de dicha enzima placentaria se asocia con RIU (Seckl 2004). Por otro lado, en situaciones de riesgo de parto prematuro el individuo puede estar sobreexpuesto a glucocorticoides, ya que éstos se administran a la mujer gestante para reducir la morbilidad neonatal. Así mismo, diversos modelos animales demuestran que la exposición del feto a glucocorticoides reduce el peso al nacer y programa para la ECV (Ortiz et al. 2001).

De lo expuesto anteriormente, se deduce que un estrés fetal debido a distintas causas pone en marcha diversos mecanismos que, a corto plazo, pueden ser beneficiosos para la viabilidad, pero que a largo plazo aumentan la susceptibilidad del individuo al desarrollo de enfermedades cardiometabólicas.

2.2. Papel del crecimiento postnatal acelerado en la programación de la ECV

Además de la importancia de la etapa intrauterina, se ha demostrado que las primeras etapas de vida postnatal también juegan un papel como factores de riesgo de desarrollo de enfermedades no transmisibles. Así, diversos estudios evidencian que un crecimiento postnatal acelerado también se asocia con alteraciones cardiovasculares y una mayor probabilidad de desarrollar ECV y metabólica en etapas posteriores de la vida (Singhal et al. 2004). Esta evidencia en humanos, se conoce desde hace tiempo en estudios en animales de experimentación en los cuales se demostró que la reducción del número de individuos en la camada, y el consiguiente aumento en la ingesta durante el periodo postnatal inmediato se asocia con elevación de las concentraciones de insulina y colesterol a largo plazo (McCance 1962, Hahn 1984). Un crecimiento postnatal acelerado también se produce en individuos con bajo peso al nacer, siendo un mecanismo compensatorio del desarrollo intrauterino subóptimo. Estos animales alcanzan al destete el mismo peso y longitud corporales, o incluso mayores que los animales control. Algunos autores han postulado que un crecimiento postnatal acelerado, es incluso más importante que la propia desnutrición fetal, para el desarrollo de ECV y sus factores de riesgo en la vida adulta, habiéndose demostrado tanto en humanos (Corpeleijn et al. 2013a) como en animales de experimentación (Howie et al. 2012).

En conjunto la importancia de las etapas fetal y perinatal para la salud cardiometabólica del individuo ha sido constatada por la OMS (Delisle 2002).

2.3. Modelos experimentales para el estudio de la programación fetal

Para llevar a cabo el estudio de los mecanismos implicados en la programación fetal se han desarrollado distintos modelos experimentales en varias especies animales, los cuales mimetizan las situaciones de estrés fetal descritas anteriormente.

2.3.1. Modelos de desnutrición fetal

Estos modelos consisten en reducir el acceso de nutrientes al feto, mediante disminución de la ingesta de la madre durante el periodo gestacional o del flujo sanguíneo feto placentario.

La nutrición de la madre puede ser modificada reduciendo las calorías totales, el aporte proteico o el de algún micronutriente de la dieta, como minerales o vitaminas. Uno de estos modelos consiste en la reducción del aporte global de nutrientes a la madre gestante entre un 30-50%. El periodo de restricción al que se somete a la madre es variable; en algunos casos se inicia en el periodo periconcepcional, en otros en una parte de la gestación o durante la gestación completa. En todos ellos se ha demostrado que la descendencia presenta elevación de la presión arterial, obesidad y otros FRCV (Edwards, McMillen 2002, Metges 2009).

Otro modelo frecuentemente utilizado es la reducción de la ingesta proteica; en roedores la dieta normal contiene un 20-22% de proteínas y en el modelo experimental se reduce a un 6-9%. Este tipo de intervención se ha demostrado que produce una mayor presión arterial y alteraciones cardiovasculares en la descendencia (Langley-Evans et al. 1994, Langley-Evans 1996, Langley-Evans et al. 1999, Tarry-Adkins et al. 2013, Menendez-Castro et al. 2014).

Una tercera forma de reducir el aporte de nutrientes al feto es mediante la reducción del flujo a la placenta, lo que mimetiza una insuficiencia placentaria. Para ello se han desarrollado diversos modelos quirúrgicos entre los que cabe destacar la ligadura uterina bilateral, usualmente durante el último tercio de la gestación, el cual mimetiza un RIU, y que también ha sido asociado con desarrollo de hipertensión en la descendencia (Tare et al. 2012, Janot et al. 2014).

2.4. Mecanismos fisiopatológicos asociados a la programación fetal

En este apartado se describen varios de los mecanismos propuestos para explicar la asociación entre un ambiente intrauterino adverso y el desarrollo de ECV y sus factores de riesgo, particularmente la hipertensión.

2.4.1. Alteraciones orgánicas asociadas a la programación fetal

Alteraciones renales. Se ha sugerido que un estrés fetal conduce a un inadecuado desarrollo renal y a una reducción en el número total de nefronas. Esto tiene como consecuencia una hipertrofia e hiperfiltración glomerular, retención renal de sodio y aumento de la presión capilar glomerular. Con el paso del tiempo, estas alteraciones conducen a una reducción irreversible de la función renal y un aumento de la presión arterial en la edad adulta (Brenner et al. 1988, Hershkovitz et al. 2007). Así, en humanos se ha constatado que un bajo peso al nacer se asocia con un menor número y volumen glomerular (Manalich et al. 2000). Por otro lado, en varios modelos animales de programación fetal también se ha demostrado que el estrés durante la etapa intrauterina produce disminución del tamaño renal, asociado a hipertensión en la edad adulta (Langley-Evans et al. 1999, Vehaskari et al. 2001, Paixao, Alexander 2013).

Alteraciones cardíacas. De forma similar a lo que se produce en riñón, la falta de nutrientes durante la vida intrauterina produce reducción del número de cardiomiocitos en el feto (Corstius et al. 2005, Stacy et al. 2009, Zohdi et al. 2014) que se manifiesta como una reducción del peso del corazón al nacimiento (Tarry-Adkins et al. 2013). También se ha demostrado que la desnutrición fetal en el adulto se asocia con remodelado cardíaco e hipertensión (Xu et al. 2006, Gray et al. 2014), así como alteraciones funcionales del corazón (Hu et al. 2000, Xu et al. 2006, Elmes et al. 2007). Las alteraciones estructurales del corazón observadas en estos modelos, pueden estar asociados con la propia hipertensión al ser esta un factor de riesgo de hipertrofia cardíaca. Sin embargo ésta también se ha descrito a edades tempranas en animales sometidos a desnutrición fetal (Gezmish et al. 2010, Tarry-Adkins et al. 2013). Al no existir estudios en los que se analice simultáneamente el desarrollo de hipertensión e hipertrofia cardíaca es difícil establecer una relación causa efecto. Por otro lado, prácticamente todos los estudios que demuestran alteraciones cardíacas en modelos animales de programación fetal se han realizado en machos, debido a que se ha demostrado que las hembras tienen un cierto grado de protección frente al

desarrollo de hipertensión, desconociéndose el impacto de la programación fetal sobre el corazón en las hembras.

Alteraciones vasculares. Un bajo peso al nacer también se asocia con alteraciones vasculares, en concreto con disfunción endotelial. Esta se ha demostrado en seres humanos habiéndose evidenciado incluso a edades tempranas (Goodfellow et al. 1998, Leeson et al. 2001). Por otro lado, estudios en diversos modelos animales -de restricción materna durante la gestación y de alteraciones del flujo uterino- han demostrado alteraciones en la función vascular; habiéndose encontrado tanto aumento de la respuesta a vasoconstrictores como reducción de las respuestas endotelio-dependientes, mediada a través de la liberación de NO (Nuyt 2008, Poston 2011). La disfunción endotelial, junto con activación de sistemas vasoconstrictores como el tono simpático o la angiotensina II (Edwards, McMillen 2001) conduce a un aumento de la resistencia vascular periférica y de la presión arterial.

Además de la disfunción vascular, también se han observado alteraciones en la estructura de los vasos asociada con la programación fetal. Se conoce desde hace tiempo la importancia de la elastina en la complianza arterial y el posible papel que una deficiente síntesis durante la etapa fetal puede tener en la programación de la hipertensión (Martyn, Greenwald 1997). Estudios posteriores en animales de experimentación han demostrado remodelado y rigidez vascular (Cheung et al. 2004, Armitage et al. 2005).

2.4.2. Mecanismos implicados en la programación fetal

Alteraciones en el sistema renina-angiotensina (SRA). Está claramente establecido que el SRA está implicado en la programación fetal, aunque todavía no está claramente establecido si es un factor causal o es un factor temprano asociado (Nuyt 2008). El papel de la angiotensina II en la programación fetal se ha demostrado en diversos modelos animales. Por ejemplo (Nuyt 2008), en animales sometidos a restricción del crecimiento presentan mayor respuesta vasopresora a angiotensina II (Edwards, McMillen 2001). Así mismo la hipertensión producida por programación fetal se previene tras el bloqueo de los receptores AT1 (Sherman, Langley-Evans 2000). La implicación de los receptores AT1 viene demostrada por el hecho de que la

expresión de estos receptores se encuentra incrementada en la descendencia de animales sometidos a desnutrición fetal (Vehaskari et al. 2004).

Modificaciones epigenéticas. Las modificaciones epigenéticas suponen cambios en la expresión génica, sin alterar la secuencia de ADN (Jaenisch, Bird 2003). Los mecanismos implicados en dicha modificación a nivel molecular son básicamente tres: la metilación del ADN, la modificación de la cromatina y los micro ARNs, siendo el primero el principal regulador epigenético del genoma (Margueron, Reinberg 2010). Los cambios epigenéticos son reversibles, a diferencia de la información genética que es altamente estable, y están influenciadas por muchos factores, entre los que pueden incluirse los hábitos alimenticios, un entorno materno desfavorable durante el embarazo y múltiples factores ambientales.

Estudios en humanos y en animales de experimentación sugieren que los cambios epigenéticos son uno de los mecanismos responsables de la programación fetal (Gluckman et al. 2009). Por ejemplo, se ha encontrado que una insuficiencia útero-placentaria produce alteraciones de la metilación asociadas a una reducción en el número de nefronas (Gicquel et al. 2008). Otros estudios demuestran que la disfunción endotelial y otras alteraciones asociadas a la hipertensión se relacionan con una reducción en la metilación de algunos genes como los que codifican para el receptor AT1 de angiotensina (Bogdarina et al. 2007), el PPAR- α (peroxisome proliferator-activated receptor α) o el receptor de glucocorticoides (Burdge et al. 2007b). También se han observado asociaciones entre reducción de micronutrientes en la gestación e hipometilación global del ADN (Sinclair et al. 2007). Estudios en supervivientes de la hambruna de Holanda, revelaron que la restricción calórica durante el periodo perinatal tuvo un efecto sobre la metilación del gen del insuline-like growth- factor IGF-2 (Heijmans et al. 2008).

Por lo tanto, la evidencia experimental apunta a que los mecanismos epigenéticos están relacionados con la expresión y mantenimiento a largo plazo de los efectos de la programación fetal (Burdge et al. 2007a).

Alteración del balance oxidativo. En tercer lugar, se ha postulado que el estrés oxidativo es otro de los nexos de unión más plausibles entre un crecimiento fetal adverso y un aumento de riesgo de desarrollar enfermedades

cardiovasculares y metabólicas en la edad adulta (Luo et al. 2006, Thompson, Al-Hasan 2012). Ya que este trabajo se centra en el balance oxidativo, se dedica un apartado específico al mismo.

2.4.3. Influencia del sexo en la programación fetal

La asociación entre un bajo peso al nacer e hipertensión se produce tanto en hombres como en mujeres (Osmond, Barker 2000, Rich-Edwards et al. 2005). Sin embargo, esta asociación y otras alteraciones relacionadas como la función renal se producen de forma más importante en varones respecto de mujeres (Li et al. 2008). Ello ha llevado a postular que la programación fetal es sexo dependiente. Estas diferencias entre sexos en la respuesta al estrés fetal, también se han observado en animales de experimentación, en los cuales se demuestra un cierto grado de protección de las hembras frente a las alteraciones inducidas por la desnutrición o la hipoxia durante la etapa fetal (Nuyt 2008). Entre los mecanismos que se han postulado para explicar estas diferencias el más estudiado ha sido la influencia de las hormonas sexuales, así se ha demostrado que la testosterona está elevada en machos expuestos a desnutrición fetal (Ojeda et al. 2007b) y que el estradiol podría jugar un papel protector en las hembras (Ojeda et al. 2007a). Sin embargo, es posible que otros mecanismos independientes de las hormonas sexuales y relacionados con el sexo puedan participar en la programación fetal de la hipertensión. Entre otros se podría considerar la influencia de la placenta ya que ésta, al estar generada por el feto, tiene su misma información genética y sexo (Gabory et al. 2009), por lo que su capacidad de responder a estímulos adversos puede estar influida por el sexo del embrión (Tarrade et al. 2015).

3. Balance oxidativo

En condiciones normales y como consecuencia del metabolismo aerobio se generan especies químicas altamente reactivas. Los más conocidos son los radicales libres -que se definen como moléculas o fragmentos de moléculas que contienen uno o más electrones desapareados-, existiendo otras especies reactivas no radicáticas (Halliwell, Gutteridge 2015). Los ROS representan la clase más abundante en los sistemas biológicos (Miller et al. 1990). Otros radicales libres de importancia biológica son los radicales derivados del nitrógeno (*Reactive Nitrosative Species*, RNS). Las especies reactivas son moléculas que, a bajas concentraciones, participan en el organismo en importantes funciones fisiológicas como la señalización celular y la defensa inmunitaria (Valko et al. 2007). Sin embargo, como estas sustancias son prooxidantes, cuando se encuentran en exceso pueden producir daño oxidativo a macromoléculas (lípidos, ADN y proteínas). El exceso de oxidación altera la función celular, contribuyendo al desarrollo de patologías como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas y la ECV (Marchesi et al. 2009, El Assar et al. 2013).

Junto con las especies reactivas, los organismos aerobios han desarrollado sistemas antioxidantes que equilibran la producción y destrucción de las moléculas oxidantes. Si el balance entre los sistemas oxidantes y antioxidantes se desequilibra a favor de los primeros, se produce el fenómeno conocido como estrés oxidativo (Sies 1997).

A continuación se describen las principales especies reactivas (sustancias prooxidantes) y sistemas antioxidantes fisiológicos.

3.1. Especies reactivas de interés biológico

Las especies reactivas, en particular los radicales libres, son moléculas altamente inestables que tienden a oxidar las moléculas de su entorno, adquiriendo electrones para estabilizarse. En este proceso, la molécula oxidada puede perder su función biológica y en algunas circunstancias puede convertirse a su vez en una molécula inestable generando reacciones en

cadena que pueden ser altamente tóxicas para las células (Halliwell, Gutteridge 2015).

En la figura 1 aparece un esquema con las principales especies reactivas de importancia biológica, las cuales se describen a continuación.

3.1.1. Radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

El oxígeno molecular tiene una configuración electrónica única y es por sí mismo un radical. La adición de un electrón produce el radical anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), el cual es considerado como un ROS primario, es decir, a partir del cual se generan otros ROS, ya sea por interacción directa con otras moléculas o mediante procesos catalizados por metales o enzimas (Valko et al. 2005). La producción de $O_2^{\cdot-}$ tiene lugar fundamentalmente en las mitocondrias de la célula, relacionada con el funcionamiento de la cadena respiratoria (Cadenas, Sies 1998). Se estima que durante la transducción de la energía se produce la fuga de una pequeña cantidad de electrones, aproximadamente del 1-3%, que interaccionan con el oxígeno molecular y forman $O_2^{\cdot-}$. Además, de la cadena de transporte de electrones como productora de $O_2^{\cdot-}$, la NADPH y la xantina oxidasa son los sistemas enzimáticos que producen este ROS en los sistemas biológicos.

3.1.2. Radical hidroxilo ($\cdot OH$)

El radical $\cdot OH$ por su elevada reactividad, es un ROS altamente tóxico para las células a pesar de su corta vida media, 10^{-9} s *in vivo*, de modo que suele reaccionar en el mismo sitio de formación (Valko et al. 2005).

El radical hidroxilo puede ser generado por varias vías, en las cuales está implicado el $O_2^{\cdot-}$. Por ejemplo, un exceso de $O_2^{\cdot-}$ favorece la liberación de hierro de las moléculas que lo contienen y mediante la reacción de Fenton genera $\cdot OH$ ($Fe^{+2} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{+3} + \cdot OH + OH^-$) (Valko et al. 2016). Por otro lado, el $O_2^{\cdot-}$ también genera $\cdot OH$ a través de la reacción de Haber-Weiss ($O_2^{\cdot-} + H_2O_2 \rightarrow O_2 + \cdot OH + OH^-$) (Kehrer 2000).

3.1.3. Radical peroxilo ($ROO\bullet$)

El radical peroxilo participa en la peroxidación de lípidos *in vivo*. Así, el radical hidroperoxilo ($HOO\bullet$), que es la forma más simple del radical peroxilo, ha sido demostrado que inicia la peroxidación de ácidos grasos (Aikens, Dix 1991).

3.1.4. Óxido nítrico (NO)

El NO se sintetiza a partir de la L-arginina por la enzima sintasa de NO (NOS), habiéndose descrito tres isoformas de esta enzima denominadas nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) e iNOS (inducible). Es bien conocido que el NO participa como molécula de señalización en muchos procesos biológicos y en particular en la regulación de la presión arterial (Umans, Levi 1995). En medio acuoso el NO tiene una vida media de pocos segundos, es estable a bajas concentraciones de oxígeno (vida media >15 s) y además, difunde con facilidad a través de la membrana citoplasmática.

El NO es un radical libre desde el punto de vista físico por poseer un electrón desapareado aunque no se conoce que induzca reacciones de propagación capaces de oxidar macromoléculas. Sin embargo, el NO puede reaccionar fácilmente con el anión superóxido para formar peroxinitritos ($ONOO^-$), que son moléculas altamente reactivas y deletéreas por su gran capacidad oxidativa.

3.1.5. Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)

El $ONOO^-$ es particularmente nocivo para las células ya que participa en la peroxidación lipídica, en la oxidación de los grupos carbonilos de las proteínas, así como en la nitración de los residuos tirosina de las proteínas. Además, es capaz de atravesar las membranas celulares, en parte, a través de canales de aniones, lo que aumenta su capacidad de daño. Por otro lado, aunque el peroxinitrito es un radical libre altamente oxidante, reacciona a una velocidad relativamente lenta con la mayoría de las moléculas.

3.1.6. Peróxido de hidrógeno (H_2O_2)

El H_2O_2 no es un radical libre pero sí es uno de los principales ROS, junto con el anión superóxido y el radical hidroxilo. El H_2O_2 se sintetiza por las superóxido dismutasas (SODs), que dismutan el $O_2^{\bullet-}$ a O_2 y H_2O . También puede

formarse por la reducción divalente del oxígeno molecular sin la formación del radical $O_2^{\bullet-}$, mediante las oxidasas de los peroxisomas. Los niveles de concentración de peróxido de hidrógeno en las células suelen ser 1000 veces mayores que los del $O_2^{\bullet-}$.

El H_2O_2 puede actuar como oxidante o como reductor. En condiciones biológicas es un oxidante débil de grupos tiol de proteínas o grupos acilo poliinsaturados en lípidos. El H_2O_2 es poco reactivo en disolución acuosa pero en exceso, resulta muy nocivo para la célula, ya que puede atravesar las membranas biológicas e inducir la formación de $\bullet OH$ (Elstner 1991).

3.2. Sistemas enzimáticos productores de ROS/RNS en el sistema cardiovascular

En las células, las mitocondrias son la fuente biológica más importante de generación de ROS, aunque éstos también se generan en la membrana, en el retículo endoplásmico y en el citoplasma. Tradicionalmente se ha asumido que la fuente principal de ROS en el sistema cardiovascular son los macrófagos; sin embargo, aunque no hay duda de que estas células juegan un papel importante, está claramente establecido que las células de la pared vascular y del tejido cardíaco producen ROS en cantidades variables en respuesta a diversos estímulos.

A continuación se describen los principales sistemas enzimáticos responsables de la generación de ROS/RNS y sus derivados en el sistema cardiovascular (Touyz, Briones 2011).

3.2.1. NADPH oxidasas

Las NADPH oxidasas son una familia de enzimas transmembrana capaces de generar $O_2^{\bullet-}$ y es el principal sistema enzimático responsable de su producción tanto en la pared vascular (Touyz et al. 2002, Lassegue, Clempus 2003) como en el corazón (Sirker et al. 2007). Existen diferentes isoformas de la NADPH oxidasa: Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5, Duox1 y Duox2, siendo Nox2 la más abundante en el sistema cardiovascular. Esta isoforma consta de 5 subunidades: una subunidad estabilizadora ($p22^{phox}$), varias subunidades

reguladoras (p40^{phox}, p47^{phox}, p67^{phox}) y la subunidad catalítica (gp91^{phox}), que es la que transfiere los electrones. Aunque las NADPH oxidasas son enzimas constitutivas, se ha demostrado que varios factores humorales, como la Angiotensina II, la Endotelina-1 o el factor de necrosis tumoral alpha (TNF- α) regulan su actividad. En los últimos años se ha evidenciado la importancia de las NADPH oxidasas en la modulación en el remodelado cardiaco (Sirker et al. 2007).

3.2.2. Xantina oxidasa (XO)

La XO cataliza la oxidación de hipoxantina a xantina formando O₂^{•-} y H₂O₂. Al igual que la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa es una enzima de membrana. Esta enzima es ubicua y existe en dos formas interconvertibles, la xantina deshidrogenasa (XDH; EC 1.1.1.204) y la xantina oxidasa (XO; 1.1.3.22). El incremento de su actividad parece estar relacionado con el desarrollo de aterosclerosis e hipertensión (Li et al. 2014), y con la patogénesis de la isquemia reperusión (Harrison 2002).

3.2.3. Mieloperoxidasa (MPO)

La mieloperoxidasa es una enzima que genera ácido hipocloroso y otras moléculas derivadas, a partir de H₂O₂. Se almacena en neutrófilos y monocitos y es una de las enzimas responsables del daño a la pared vascular en aterosclerosis (Bonomini et al. 2008).

3.2.4. Sintasa de óxido nítrico (NOS)

En condiciones fisiológicas la NOS genera NO, el cual participa en el control del tono vascular y de la presión arterial. Sin embargo, la NOS puede ser fuente de ROS en determinadas situaciones. En concreto, si se produce una deficiencia en el sustrato, L-arginina, o en alguno de los cofactores del enzima, como la tetrahidrobiopterina (BH₄), la vía de producción de NO se desacopla y se genera O₂^{•-} (Li et al. 2014).

3.2.5. Otros sistemas enzimáticos

Además de los sistemas enzimáticos mencionados anteriormente, existen otras enzimas como la lipoxigenasa, ciclooxigenasa, citocromo P-450 monooxigenasa, que también pueden generar ROS en el sistema cardiovascular (Bonomini et al. 2008).

3.3. Mecanismos de defensa antioxidante

La mayor parte de los radicales libres generados por el organismo son eliminados mediante mecanismos de defensa endógenos, conocidos como antioxidantes. Un antioxidante se puede definir como una sustancia que, a bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retrasa o previene su oxidación (Halliwell, Gutteridge 2015). Los antioxidantes pueden ser generados por las propias células o incorporados exógenamente en la dieta, teniendo mayor relevancia biológica los primeros. Los sistemas de defensa antioxidante en el organismo pueden clasificarse en dos grupos: sistemas de defensa enzimáticos y sistemas de defensa no enzimáticos. Los sistemas enzimáticos se encuentran mayoritariamente dentro de la célula pero pueden salir al espacio extracelular y encontrarse en fluidos corporales. Entre los sistemas enzimáticos antioxidantes más importantes están las superóxido dismutasas (SODs), la catalasa y la glutatión peroxidasa. Además de estos sistemas enzimáticos, existen pequeñas moléculas con capacidad antioxidante, como glutatión, moléculas con grupos tiol y ácido úrico, entre otros, que constituyen una primera línea de defensa frente a ROS actuando como secuestradores.

3.3.1. Superóxido dismutasa (SOD)

La superóxido dismutasa constituye la primera defensa enzimática que presenta la célula para hacer frente a la producción de radical $O_2^{\bullet-}$. Esta enzima cataliza la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ con la consiguiente formación de H_2O_2 y O_2 . Se han caracterizado tres isoenzimas en mamíferos, que difieren tanto en su localización celular como en los cofactores metálicos de sus centros activos: Cu/Zn-SOD (SOD1); Mn-SOD (SOD2) y la extracelular (EcSOD, SOD3) (Zelko et al. 2002).

SOD1 es la principal SOD intracelular, localizada en el citoplasma con una

pequeña fracción en el espacio intermembrana de la mitocondria (Crapo et al. 1992). Su actividad depende de la presencia de Zn y principalmente de Cu (Valentine et al. 1979). El mecanismo mediante el cual actúa como *eliminador* de $O_2^{\bullet-}$ involucra la reducción y re-oxidación del cobre en el sitio activo de la enzima. La SOD1 puede pasar al plasma, donde tiene una vida media entre 6-10 min (Gorecki et al. 1991).

SOD2 es una enzima que contiene manganeso (Mn) y está localizada en la matriz mitocondrial (Fridovich 1986). El Mn presente en el sitio activo sirve para catalizar la dismutación del $O_2^{\bullet-}$. A diferencia de la SOD1, la SOD2 no es inhibida por H_2O_2 (Beyer WF, Fridovich 1987). Su vida media en suero es de 5-6 h (Gorecki et al. 1991).

SOD3 se encuentra fundamentalmente en el espacio extracelular, en la superficie celular y una pequeña fracción en el plasma y fluidos extracelulares. Su distribución en los distintos tejidos varía entre especies, pero en general se expresa de manera altamente selectiva en vasos sanguíneos, pulmones, riñones, hígado y en menor proporción en el cerebro (Folz, Crapo 1994). En tejidos dañados y aterosclerosis, la SOD3 ha sido también encontrada en células inflamatorias.

3.3.2. Catalasa

La catalasa es una hemo-enzima antioxidante complementaria de las SODs, debido a que cataliza la transformación de H_2O_2 a O_2 y H_2O . Es particularmente importante en situaciones de elevada producción de $O_2^{\bullet-}$. La catalasa puede descomponer millones de moléculas de H_2O_2 en cada segundo sin producir radicales libres (Young, Woodside 2001). Esta enzima está compuesta por cuatro subunidades, lo que la hace muy resistente a cambios en el pH, desnaturalización térmica y proteólisis (Goyal, Basak 2010). La cantidad y actividad de la enzima depende del tejido donde se localice (Szasz et al. 2007). Esta enzima también puede ser liberada al plasma por los neutrófilos (Berzosa et al. 2011).

3.3.3. Glutación peroxidasa (GPx)

La GPx junto con la catalasa participa en la detoxificación del H₂O₂ (Groussard et al. 2003), además de eliminar otros hidroperóxidos.

Se han identificado varios subtipos de GPx, algunos de los cuales, además de detoxificar el H₂O₂ son capaces de eliminar otros hidroperóxidos orgánicos (Brigelius-Flohé 1999). En plasma, la principal fuente de GPx es el riñón (Bjornstedt et al. 1994). Además, también se ha evidenciado que los neutrófilos pueden liberar GPx al plasma (Berzosa et al. 2011).

3.3.4. Glutación (GSH)

El glutación es un péptido compuesto por tres aminoácidos: γ -L-glutamina, L-cisteína y glicina. El glutación es el mayor componente sulfhidrilo no proteico presente en las células de mamíferos a concentraciones de 0,5 a 10 mM, con una vida media de segundos – minutos (Ballatori et al. 2009).

El glutación puede encontrarse en dos formas: reducida (GSH) y oxidada (GSSG), en la que dos tripéptidos están unidos por un puente disulfuro. El paso de la forma reducida GSH a la oxidada GSSG está catalizado por la glutación peroxidasa.

El GSH es el principal antioxidante intracelular de bajo peso molecular. Además se encuentra en grandes cantidades en el plasma sanguíneo, ya que puede ser transportado a través de la membrana plasmática a alta velocidad (Ballatori et al. 2009).

Los principales roles protectores del GSH contra el estrés oxidativo comprenden: 1) su participación como cofactor de varias enzimas de detoxificación, tales como la GPx, 2) su acción directa como *scavenger* de \bullet OH y oxígeno *singlete*, 3) su capacidad de regenerar antioxidantes importantes como el ácido ascórbico y vitamina E a sus formas activas (Valko et al. 2007).

3.3.5. Melatonina

La melatonina o N-acetil-5-metoxitriptamina es una neurohormona del grupo de las indolaminas descrita por primera vez por McCord y Allen (1917). La melatonina es sintetizada por la glándula pineal a partir del aminoácido L-triptófano, que posteriormente es convertido en serotonina. La síntesis y liberación pineal de esta hormona a la circulación está bajo influencia del ciclo luz/oscuridad (Liebmann et al. 1997), por ello se la conoce comúnmente como “hormona del sueño” al ser su síntesis activada durante la noche (Guerrero et al. 2007). Si se invierten las condiciones de luz exterior se invierten de modo paralelo las actividades enzimáticas y la biosíntesis pineal de las indolaminas.

Esta hormona tiene diversas acciones biológicas, de las cuales la más conocida es la relacionada con la regulación de los ritmos circadianos (Reiter 1997, Kennaway, Wright 2002). Además, la melatonina también posee acciones antiinflamatorias y oncostáticas (Blask et al. 2002, Cuzzocrea, Reiter 2002, Guerrero, Reiter 2002). Por otro lado la melatonina tiene efectos antioxidantes y de protección frente al envejecimiento celular (Reiter 1997, Reiter et al. 1999, Reiter, Tan 2003, Tan et al. 2003). Debido su carácter anfipático, la melatonina posee mayor capacidad reductora que otros antioxidantes (Reiter 2004), aunque tiene una acción más corta en el tiempo, ya que se metaboliza más rápidamente -su vida media oscila entre 20 y 90 minutos- (Illnerova et al. 1979, Vakkuri et al. 1985). A pesar de ello, se ha demostrado que las reacciones que desencadenan la melatonina y sus derivados producen un efecto antioxidante a largo plazo (Bonfont-Rousselot, Collin 2010). Esto puede ser debido a que además de tener un efecto directo como *scavenger* de radicales libres es capaz de estimular la expresión de otros sistemas antioxidantes endógenos como la GPx, la catalasa y la SOD (Reiter, Tan 2003). Además, los metabolitos derivados de la melatonina también poseen carácter antioxidante, siendo el principal la 6-sulfatoximelatonina que puede encontrarse en sangre y en orina (Guerrero et al. 2007).

3.3.6. Coenzima Q10

La coenzima Q10 o ubiquinona 50 es un constituyente natural de la cadena de transporte de electrones. La Q10 es un compuesto liposoluble, que difunde rápidamente a través de la membrana mitocondrial interna. La forma reducida de la coenzima Q10 (ubiquinol) tiene capacidad de eliminar radicales libres y de inhibir la peroxidación lipídica (Allewaert et al. 1995).

3.3.7. Ácido úrico

Es un producto de desecho del metabolismo de las purinas, que tiene capacidad de secuestrar diversos ROS. Además puede prevenir la oxidación, por su capacidad de unirse a iones Cu^{2+} y Fe^{2+} , reduciendo su participación en la reacción de Fenton (Arce, Pérez 2014).

Es importante destacar que a altas concentraciones el ácido úrico puede actuar como prooxidante.

3.3.8. Antioxidantes de origen exógeno

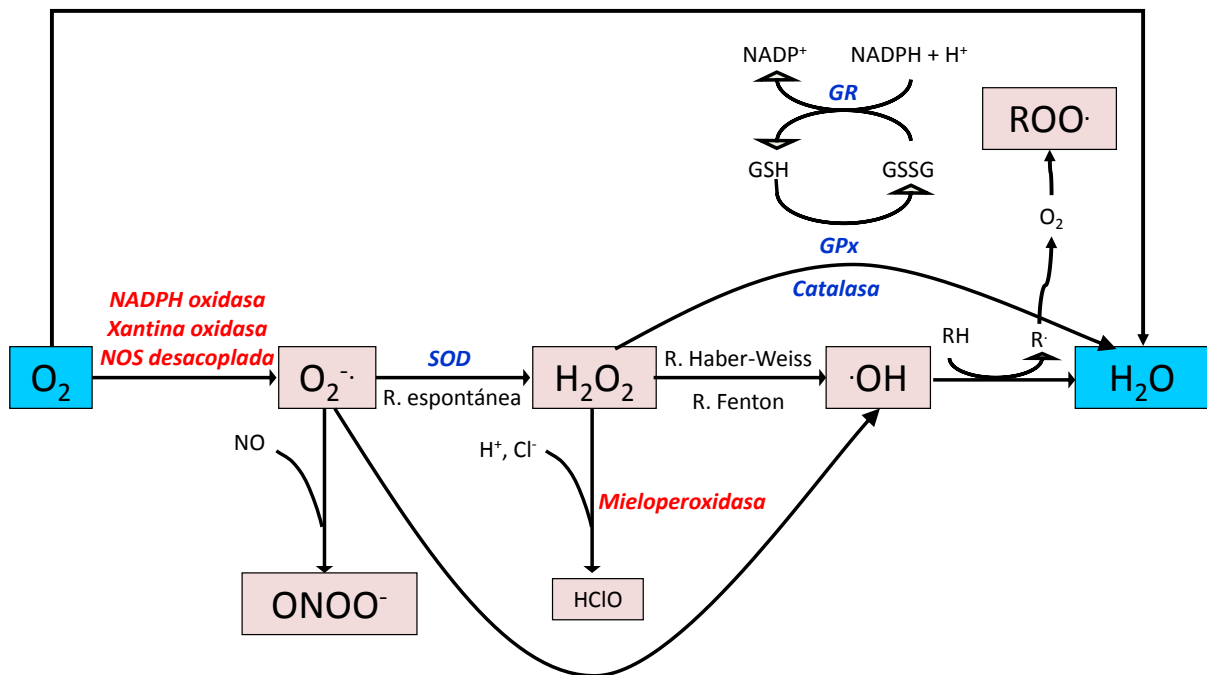
La dieta es una fuente importante de antioxidantes particularmente compuestos fenólicos y vitaminas (Balasundaram et al. 2006).

Vitamina C (ácido ascórbico). La vitamina C está presente en numerosos alimentos de origen vegetal. Puede actuar como antioxidante celular y además de participar como cofactor de diversas enzimas también participa en el reciclaje de la vitamina E (Padayatty, Levine 2001).

Vitamina E. La vitamina E está presente en diversos alimentos como productos lácteos y aceites vegetales. Es un antioxidante liposoluble capaz de eliminar radicales libres y de inhibir procesos de peroxidación lipídica de las membranas (Atkinson et al. 2008).

Polifenoles. Los polifenoles son los principales antioxidantes adquiridos a través de la dieta al encontrarse en mayor concentración que las vitaminas C o E (Lotito, Frei 2006). Se ha demostrado que los polifenoles tienen una importante capacidad antioxidante *in vitro*. Sin embargo su actividad *in vivo* es más cuestionable y puede estar limitada por factores como la capacidad de absorción, la biodisponibilidad o la tasa de depuración (Manach et al. 2005).

Figura 1. Esquema sobre las reacciones de formación y eliminación de ROS y los sistemas de defensa antioxidante



O_2 , oxígeno molecular; $O_2^{\cdot-}$ radical anión superóxido; H_2O_2 peróxido de hidrógeno; $\cdot OH$, radical hidroxilo; H_2O , agua; NO, óxido nítrico; $ONOO^-$, anión peroxinitrito; SOD, superóxido dismutasa; GPx, glutatión peroxidasa; GR, glutatión reductasa; GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; R^\cdot , radical.

3.4. Biomarcadores de daño oxidativo

Los niveles de ROS y RNS son difíciles de medir en sistemas biológicos, por su corta vida media. Por ello, en lugar de detectarlos directamente, se miden otras moléculas más estables, producto del daño oxidativo que producen sobre diversas macromoléculas -proteínas, lípidos y ADN-. Estos biomarcadores pueden ser detectados en tejidos y en fluidos biológicos, como el plasma y la orina. La cuantificación de estas moléculas es un índice de la susceptibilidad de las macromoléculas a la oxidación y han sido utilizadas como marcadores de estrés oxidativo.

A continuación se describen los biomarcadores de estrés oxidativo más importantes.

Biomarcadores de oxidación de proteínas. En plasma, el daño oxidativo se produce mayoritariamente sobre las proteínas. En las proteínas se puede producir daño oxidativo sobre los residuos de carbonilos; también es frecuente

la nitración de residuos de tirosina y también se puede medir la fracción oxidada de albúmina, que es la proteína más abundante en plasma (Berlett, Stadtman 1997).

Biomarcadores de oxidación lipídica. En las membranas celulares un exceso de ROS provoca la oxidación de los ácidos grasos poliinsaturados dando lugar a la formación de aldehídos, que son productos estables y que pueden ser cuantificados. Los aldehídos más estudiados son el 4-hidroxinonanal (4-HNE), los isoprostanos y el malondialdehído (MDA).

Biomarcadores de oxidación del ADN. Los ácidos nucleicos también son susceptibles de daño oxidativo mediado por ROS y RNS. El biomarcador más frecuentemente utilizado como medida del daño a ADN es el 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG).

4. Estrés oxidativo y programación fetal.

El estrés oxidativo se define como un desequilibrio entre la producción y eliminación de especies reactivas y tiene como consecuencia un daño oxidativo a macromoléculas. Por ello, el estrés oxidativo está en la base de numerosas enfermedades como el cáncer, la artritis reumatoide y enfermedades neurodegenerativas (Parkinson y Alzheimer) (Chaitanya et al. 2010). También es bien conocido que el estrés oxidativo juega un papel importante en la patogénesis y desarrollo de ECV y sus factores de riesgo como la hipertensión, la dislipemia y la aterosclerosis (de Champlain et al. 2004, Linke et al. 2005). Por esta razón, el estrés oxidativo se ha postulado como uno de los posibles mecanismos que explican la asociación entre estrés fetal y desarrollo posterior de ECV (Thompson, Al-Hasan 2012). Existen varias evidencias en humanos y en animales de experimentación que apoyan esta hipótesis. Así se ha demostrado que neonatos con RIU presentan niveles plasmáticos más altos de daño oxidativo y una disminución de la actividad de algunas enzimas antioxidantes (Hracsko et al. 2008). Así mismo, también se han observado índices elevados de peroxidación lipídica en el plasma de las madres que presentan RIU (Biri et al. 2007). Por otro lado, mujeres con insuficiencia placentaria también tienen alteraciones plasmáticas que indican un elevado daño oxidativo (Bayhan et al. 2005). Estos datos sugieren una asociación entre un inadecuado aporte de nutrientes al feto y un estrés oxidativo en la placenta. Sin embargo, no se conoce si estas alteraciones tienen o no repercusión a largo plazo sobre la salud cardiovascular, debido a la dificultad de realizar estudios longitudinales en el ser humano. Por ello, los animales de experimentación son útiles para evaluar lo que ocurre a lo largo del tiempo tras una intervención en la etapa intrauterina, habiéndose realizado estudios en modelos animales de programación fetal para evaluar la posible asociación entre un estrés fetal y un desequilibrio en el balance oxidativo. Estos estudios han demostrado que los animales que han sufrido una nutrición subóptima durante la etapa fetal presentan alteraciones cardiovasculares junto con daño oxidativo e hipertensión (Nuyt 2008).

La mayoría de los estudios que evalúan el papel del estrés oxidativo en la programación fetal, se han llevado a cabo en descendientes en la edad adulta,

donde ya se han establecido alteraciones orgánicas e hipertensión. Por ello es difícil establecer si el estrés oxidativo es causa de la desnutrición fetal o es una consecuencia del daño oxidativo asociado a la propia hipertensión.

Por otro lado, el papel del sexo en la programación fetal no ha sido suficientemente estudiado, habiéndose estudiado fundamentalmente la influencia de los estrógenos (Grigore et al. 2008a). Sin embargo, pueden existir otras diferencias entre sexos que puedan contribuir a la mayor protección de las hembras frente al estrés fetal. Por ejemplo la placenta, que tiene el mismo sexo que el individuo y parece jugar un papel importante en la programación fetal en el humano como fuente de estrés oxidativo. Por otro lado, es posible que existan diferencias de maduración orgánica en función del sexo, estando bien establecido que las hembras tienen un desarrollo más temprano que los machos y por lo tanto, un grado de maduración mayor, lo cual les podría conferir una mayor protección frente situaciones de estrés.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hypothesis and Objectives

Premisas e hipótesis del estudio

- Estudios epidemiológicos y experimentales evidencian que un bajo peso al nacer predispone al desarrollo de ECV y sus factores de riesgo, como obesidad e hipertensión.
- El estrés oxidativo es un denominador común en la hipertensión arterial y en la hipertrofia ventricular asociada.
- En modelos animales de programación fetal se ha descrito que las hembras presentan cierta protección frente al desarrollo de hipertensión, habiéndose sugerido que tiene relación con las hormonas sexuales.
- Los mecanismos responsables de la asociación entre el bajo peso al nacer y la ECV no están completamente establecidos, desconociéndose cómo influye el sexo.

Basándose en las premisas anteriores, se postulan las siguientes **hipótesis**:

- La nutrición subóptima durante la etapa fetal produce alteraciones del balance oxidativo, previas al desarrollo de hipertensión, que son diferentes en machos y hembras.
- Las hembras sometidas a desnutrición durante la etapa fetal están protegidas frente al desarrollo de hipertensión y de alteraciones cardíacas.

Objetivos

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es analizar, en función del sexo, si un estrés oxidativo en la etapa perinatal está implicado en la programación fetal de la hipertensión y el desarrollo de hipertrofia cardíaca.

Para ello se utiliza un modelo experimental en rata en el que se reduce la ingesta materna al 50% durante la segunda mitad de la gestación, analizando las alteraciones producidas en la descendencia.

Se plantean los siguientes **objetivos concretos**:

1. Evaluar la influencia de la desnutrición fetal sobre el desarrollo corporal.

- Determinar el peso y la longitud de los animales al nacimiento, a los 7 días de edad, al destete (21 días) y en la edad adulta (6 meses).
- Evaluar el fenómeno de aceleración del crecimiento (*catch up growth*) durante el periodo postnatal.
- Determinar si la desnutrición fetal afecta a los niveles de hormonas sexuales y el inicio de la pubertad.

2. Evaluar la influencia de la desnutrición fetal en el desarrollo de hipertensión.

- Determinar si la desnutrición fetal afecta a los valores de presión arterial al destete y en la edad adulta.

3. Analizar la influencia de la desnutrición fetal en el estatus oxidativo plasmático y su relación con el desarrollo de hipertensión.

- Determinar los principales antioxidantes endógenos presentes en plasma, así como el daño oxidativo a proteínas al destete y en la edad adulta.
- Calcular un índice del estado oxidativo global (Oxy-score), a partir de los biomarcadores plasmáticos analizados.
- Evaluar la relación entre el estado oxidativo global y los valores de presión arterial.

4. Evaluar el desarrollo temporal de hipertrofia cardiaca y su relación con la presión arterial.

- Evaluar el peso y tamaño de los ventrículos y su relación con la presión arterial.
- Evaluar la función y estructura cardiaca, mediante ecocardiografía.

- 5. Determinar la posible relación entre hipertrofia ventricular y las alteraciones del balance oxidativo en el tejido cardiaco.**
 - Determinar la expresión de las principales enzimas implicadas en la producción y eliminación de radicales libres, al destete y en la edad adulta.
- 6. Determinar la influencia del sexo en las alteraciones inducidas por la desnutrición fetal.**

Basis and hypotheses of the study

- Epidemiological and experimental studies demonstrate that low birth weight predisposes to the development of cardiovascular diseases and some of its risk factors, such as obesity and hypertension.
- Oxidative stress is a common denominator in hypertension and associated ventricular hypertrophy.
- In animal models of fetal programming, it has been described that females have some protection against the development of hypertension, which has been suggested to be related to sex hormones.
- The mechanisms responsible for the association between low birth weight and cardiovascular disease are not completely understood, and in particular the influence of sex has not been fully established.

Based on the above assumptions, the following **hypotheses** are postulated:

- Suboptimal nutrition during fetal life produces oxidative balance alterations, prior to the development of hypertension, which are different in males and females.
- Females exposed to undernutrition during fetal life are protected against the development of hypertension and cardiac disorders.

Objectives

The **general objective** of this Thesis is to analyze if oxidative stress in the perinatal period is involved in fetal programming of hypertension and cardiac hypertrophy, establishing the role of sex.

To achieve this objective, an experimental rat model in which maternal intake is reduced to 50% during the second half of gestation, was used, studying the alterations in the offspring.

The study had the following **specific objectives**:

1. To assess the influence of fetal undernutrition on growth.

- To determine the length and weight of the animals at birth, at 7 days of age, at weaning (21 days) and in adulthood (6 months).
- To evaluate the phenomenon of catch up growth during the postnatal period.
- To determine whether fetal undernutrition affects the levels of sex hormones and the onset of puberty.

2. Evaluate the influence of fetal undernutrition on hypertension development.

- To determine whether fetal malnutrition affects blood pressure values at weaning and in adult age.

3. To analyze the influence of fetal undernutrition on plasma oxidative status and its relationship with hypertension development.

- To assess the main endogenous antioxidants present in plasma and the level of oxidative damage to proteins at weaning and in adult age.
- To calculate an index of overall oxidative status (Oxy-score) from the measured plasma biomarkers.
- To evaluate the relationship between the overall oxidative status and blood pressure.

4. To evaluate the temporal development of cardiac hypertrophy and its relation to blood pressure.

- To evaluate ventricular weight and morphology and its relationship with to the blood pressure level.
- To evaluate cardiac structure and function by echocardiography.

- 5. To determine the possible relationship between ventricular hypertrophy and alterations in oxidative balance in cardiac tissue.**
 - To determine the expression of key enzymes involved in the production and elimination of free radicals at weaning and in adult age.

- 6. To assess the influence of sex in the alterations induced by fetal undernutrition.**

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelo experimental

Los experimentos se realizaron en ratas Sprague-Dawley (SD) de la colonia mantenida en las instalaciones del animalario de la Universidad Autónoma de Madrid. Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo bajo supervisión del Gabinete Veterinario de la Universidad Autónoma de Madrid y fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid, de acuerdo con la Guía de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (National Institutes of Health publication no. 85-23, revised in 1996), la Legislación Española (RD 1201/2005) y de la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos.

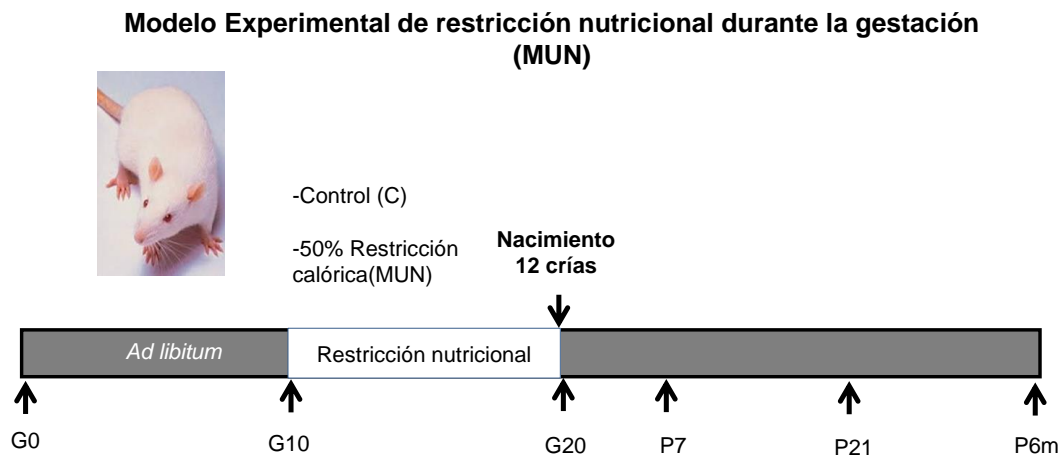
Se utilizó un modelo experimental de “programación fetal” que consiste en la restricción global de nutrientes durante una parte de la gestación. En concreto, las ratas gestantes tuvieron dieta *ad libitum* durante la primera mitad de la gestación (días 1-10); posteriormente la cantidad de pienso se redujo al 50% durante la segunda mitad de la gestación (días 11 hasta el parto). Desde el parto y durante toda la lactancia, las ratas madre tuvieron pienso *ad libitum*. Para calcular el 50% de la ingesta normal de una rata gestante se llevaron a cabo experimentos preliminares en los que se determinó que la ingesta máxima está en 24 g diarios. Durante todo el periodo, la dieta que se administró fue el pienso de cría para rata y ratón SAFE A03, cuya composición es de 51.7% carbohidratos, 21.4% proteína, 5.1% lípidos, 3.9% fibra, 5.7% minerales y 12.2% humedad. El agua de bebida fue suministrada *ad libitum* en todos los casos. Para la intervención nutricional se eligió la segunda mitad de la gestación en la cual la placenta ya está formada, para evitar que una alteración en su formación influyera en la interpretación de los resultados.

Se establecieron dos grupos de estudio: un grupo control (C), con alimentación *ad libitum* a lo largo de toda la gestación y lactancia y un grupo con restricción de la ingesta (MUN, *maternal undernutrition*), como se ha descrito previamente. Los animales fueron alojados en cubetas de Makrolon tipo III, con las siguientes dimensiones: 36.5 cm de largo, 21.5 cm de ancho y 18.5 cm de alto. Las cubetas se situaron en habitaciones con temperatura regulada (19-23°C), humedad relativa controlada (35-45%) y fotoperiodo 12h luz/ 12 h oscuridad.

El método utilizado para conocer el día de cubrición fue colocar a la pareja en una cubeta con fondo de rejilla sobre papel de filtro. La mañana siguiente al día de la cópula, se pudo observar la presencia de tapón vaginal mucoso en el suelo de la cubeta. En ese momento, se separó a la hembra del macho y se consideró como día 1 de la gestación.

El día siguiente al parto se volvió a ofrecer pienso *ad libitum* a la madre. Las crías fueron pesadas individualmente y sexadas, y la camada fue estandarizada a 12 crías, 6 machos y 6 hembras siempre y cuando fuera posible. El resto de la camada fue sacrificada mediante cámara de CO₂.

Figura 2. Modelo experimental de restricción nutricional durante la gestación.



Modelo Experimental de restricción global nutricional en la rata gestante. G0, día 0 de gestación; G10, día 10 de gestación; G20, día 20 de gestación; P7, día postnatal 7; P21, día postnatal 21; P6m, postnatal 6 meses.

2. Diseño experimental

La descendencia de ratas MUN y Control se analizó a distintas edades: al nacimiento (24 horas), a la semana 1 posnatal (7 ± 2 días), al destete (21 ± 2 días) y en la edad adulta (6 meses).

En la rata madre se midió la glucemia al destete, que es el momento en el que se separa de las crías. En todos los experimentos para la extracción de órganos los animales se anestesiaron en una cámara de CO₂, tras lo cual se pesaron y se obtuvo una muestra de plasma mediante punción cardiaca.

Para el estudio de la descendencia se utilizaron animales de varias camadas diferentes, en cada edad, realizándose los estudios descritos en la tabla adjunta (Tabla 1).

Tabla 1. Determinaciones llevadas a cabo en la descendencia de ratas MUN y control.

24 horas	7 ± 2 días	21 ± 2 días	6 meses
Peso corporal	Medidas corporales (peso, tibia)	Medidas corporales (peso, tibia)	Medidas corporales (peso, tibia)
	Peso corazón	Glucemia Hormonas	Glucemia
		Peso corazón Histología	Peso corazón
		Presión arterial <i>in vivo</i>	Presión arterial <i>in vivo</i>
		Medidas plasmáticas de biomarcadores de estrés oxidativo	Medidas plasmáticas de biomarcadores de estrés oxidativo
		Expresión de enzimas relacionadas con estrés oxidativo en tejido cardiaco	Expresión de enzimas relacionadas con estrés oxidativo en tejido cardiaco
			Ecocardiografía

3. Métodos experimentales

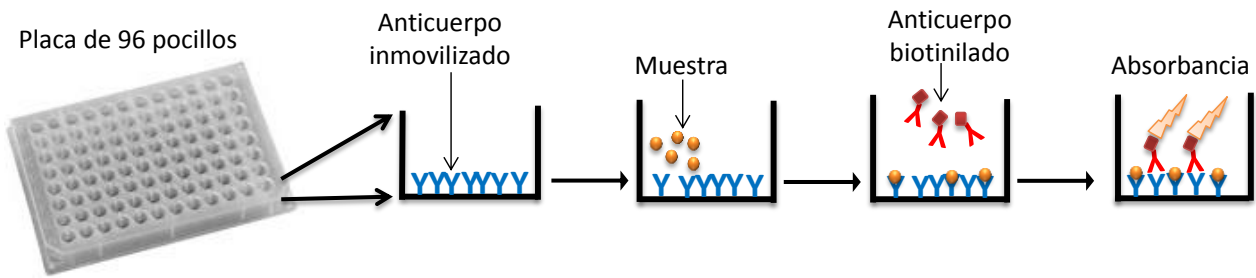
3.1. Procesamiento de muestras de sangre

De la sangre obtenida, se utilizó una gota para medir la glucemia mediante un glucómetro (Accu-check Aviva, Roche) a las 14:00 p.m. El resto de sangre se colocó en tubos eppendorf conteniendo heparina al 5% y se centrifugó a 10.000 rpm, 4°C durante 10 minutos. El plasma obtenido se alicuotó y se congeló a -80°C, hasta su posterior utilización.

3.2. Determinaciones de hormonas en plasma mediante ELISA

La concentración de hormonas (estradiol y testosterona) se determinó en el plasma de ratas, machos y hembras de 21 días. Para ello se utilizaron los kits comerciales DEMEDITEC Estradiol ELISA DE2693 y DEMEDITEC Testosterone ELISA DE1559; Diagnostics GmbH Germany.

Estos kits consisten en un ensayo en fase sólida de inmunoadsorción unido a enzimas, basado en el principio de unión competitiva (Figura 3). Brevemente, una cantidad desconocida de hormona presente en la muestra y una cantidad conocida de hormona conjugada con peroxidasa de rábano, compiten por los sitios de unión del anticuerpo de la hormona presente en los pocillos de una microplaca. Cada muestra y el estándar se cargaron por duplicado y tras la reacción, se leyó la absorbancia en un lector de placas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Biotek, VT, USA) a 450 ± 10 nm, dentro de los 15 minutos después de la finalización del protocolo. La concentración de la hormona en la muestra es inversamente proporcional a la densidad óptica medida. Para el cálculo de resultados se utilizaron los valores de absorbancia media de cada duplicado de la muestra y se determinó la concentración de cada una de ellas a partir de la curva estándar.

Figura 3. Principio básico de la técnica de ELISA competitivo

La placa de 96 pocillos está tapizada con el anticuerpo específico (inmovilizado) frente al antígeno a determinar. Se añade la muestra que contiene el antígeno. Se adiciona el anticuerpo secundario marcado con la enzima (biotina) que en presencia de su sustrato da un producto coloreado soluble, este producto es cuantificado mediante un lector de placa.

3.2.1. Determinación de melatonina en plasma

Con el fin de obtener las muestras de sangre durante las horas en las que los niveles de melatonina son máximos (hacia las 2:00 a.m.) y no tener que llevar a cabo las extracciones de madrugada, las ratas se sometieron a un cambio de ciclo luz/oscuridad. Para ello, se expusieron a luz artificial desde las 16:00 h hasta las 3:59 a.m, mientras que desde las 4:00 a.m. hasta las 15:59 h se mantuvieron en oscuridad.

La entrada de las ratas a la cámara con el fotoperiodo cambiado se realizó a los 21 días de edad y las ratas se mantuvieron en ella durante 15 días, tras los cuales se extrajo la muestra de sangre. Los niveles de melatonina en plasma se analizaron mediante un kit de inmunoensayo enzimático (Melatonin ELISA, IBL-Hamburgo, Alemania), como se ha descrito anteriormente.

3.3. Medidas corporales

En las ratas gestantes se determinó el peso corporal en una báscula (Denver Instrument SI-8801) al inicio de la gestación, a la mitad y al final de la misma. En la descendencia, tanto control como MUN, se midió el peso corporal y la longitud de la tibia -con un calibre digital (Conecta Nessler Spain)- a los 7 días, 21 días y 6 meses de edad. A estas edades también se pesó el corazón (Balanza analítica PCE-AB Clase I), el cual se relativizó tanto al peso corporal como a la longitud de la tibia.

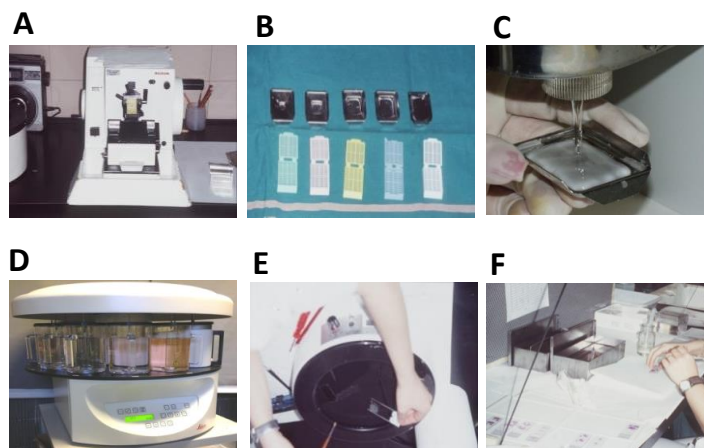
3.4. Histología cardiaca

A los 21 días de edad se llevó a cabo el estudio histológico del tejido cardiaco. Tras realizar un corte transversal del corazón, las piezas se fijaron por inmersión en formol neutro tamponado al 4%, durante 72 horas. Se deshidrató el tejido en una batería de alcoholes creciente (OH 50°, 70°, 80°, 96°, 100°) y se aclaró en xilol. Todas estas piezas fueron incluidas en parafina utilizando un procesador de tejidos (Autotechnicon Duo®).

Una vez obtenidos los bloques de parafina, se realizaron 3 cortes seriados de 20 µm de espesor, mediante un micrótopo (Ernst Leitz GMBH (Typ 1212, Wetzlar Germany®). Las secciones se desparafinaron en xilol (3 lavados de 10 min cada uno), se hidrataron en alcoholes de concentraciones decrecientes y se tiñeron con PAS (ácido periódico y reactivo de Schiff). Como medio de montaje se utilizó DePex (SERVA).

Las secciones de corazón se observaron utilizando un microscopio óptico Olympus DMLB con una cámara de alta resolución integrada Leica DC200. Se eligió como primera sección de tejido aquella que no tenía cuerdas tendinosas, utilizando para ello un objetivo X10. Las áreas miocárdicas fueron medidas con el software de análisis Image J, y se expresan en mm².

Figura 4. Resumen de la técnica de procesado de tejidos

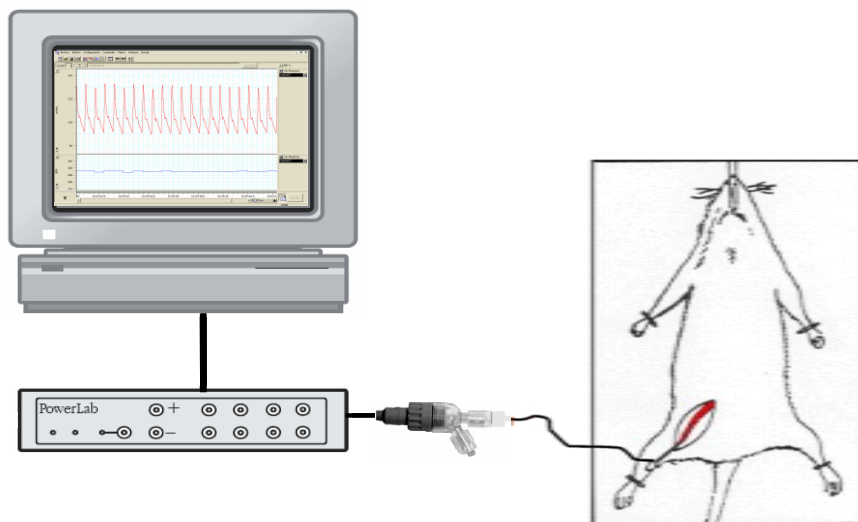


Microtopo (A); cassettes (B); dispensador de parafina (C); procesador de tejidos (D); baño de flotación (E); montaje (F).

3.5. Medida de parámetros hemodinámicos en ratas anestesiadas

La presión arterial sistólica (PAS), la presión arterial diastólica (PAD) y la frecuencia cardíaca (FC) se midieron de forma directa en los animales anestesiados (Ketamina 80 mg/kg- Xilacina 10 mg/kg). Para ello, tras la anestesia, se insertó en la arteria iliaca derecha una cánula conectada a un transductor de presión (Statham, Harvard Aparatos GMBH, Alemania). La onda de presión arterial se registró en un ordenador PC, mediante el sistema de adquisición de datos con el programa PowerLab system (ADInstruments) durante 60 minutos. La PAS, la PAD y la FC se midieron en la porción final del registro.

Figura 5. Esquema de la medida directa de la onda de presión arterial en la rata anestesiada



3.6. Medidas de parámetros de estrés oxidativo en plasma

3.6.1. Cuantificación de proteínas totales

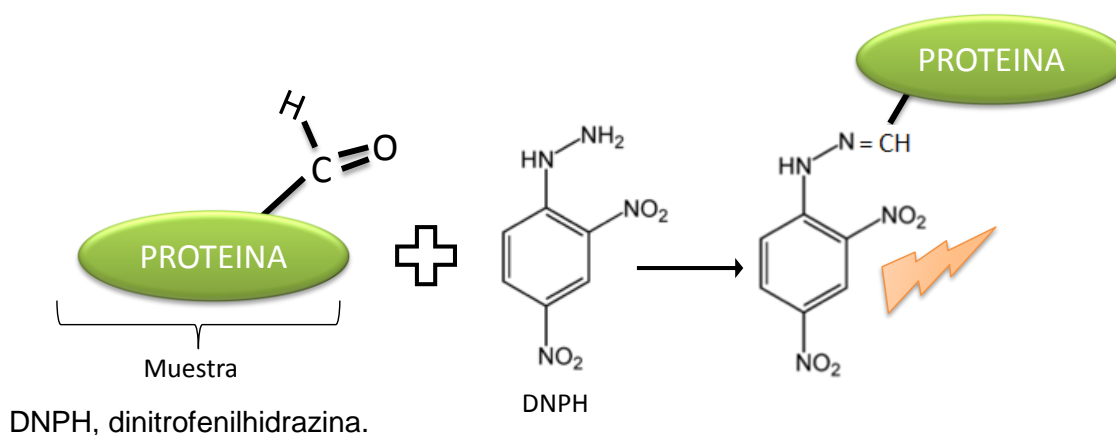
El contenido de proteínas de las muestras de plasma se midió empleando el método de Bradford adaptado a un lector de placas. De acuerdo al protocolo descrito por el fabricante, se hizo reaccionar 10 μL de muestra diluida con 200 μL del reactivo de Bradford (colorante de azul Coomassie, Bio-Rad, España) diluido 1:4 y después de 5 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Biotek, VT, USA).

La concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se estimó a partir de una recta de calibrado con albúmina de suero de bovino, en el rango de 0.0- 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.6.2. Cuantificación de proteínas carboniladas

La cantidad de proteínas carboniladas plasmáticas se midió de acuerdo al método basado en la dinitrofenilhidrazina (DNPH) (Hawkins et al. 2009). La DNPH reacciona con grupos carbonilos formados en las proteínas mediante procesos oxidativos. El compuesto formado es capaz de absorber a 370 nm y ello constituye una medida de la cantidad de carbonilos presente en la proteína de una muestra biológica.

Figura 6. Esquema de la reacción entre grupos carbonilos proteicos y la DNPH.



Protocolo experimental.

25 μL de plasma se mezclan con 25 μL de DNPH (10 Mm, disuelto en HCl 2.5M) en tubos eppendorf. Después la mezcla se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min. Cada 5 minutos los tubos se agitaron en un vortex para favorecer la reacción entre los grupos carbonilos y la DNPH. Las proteínas plasmáticas totales se precipitaron en frío con ácido tricloroacético (20% p/v) durante 30 minutos. Mediante centrifugación a 2100 g, 30 min y a 4°C, se obtuvieron los pellets proteicos, los cuales se lavaron y centrifugaron dos veces en una mezcla fría de etanol/acetato de etilo (1:1 v/v) para eliminar el exceso de DNPH. A continuación, los pellets se disolvieron en Guanidina-HCl (6M) y finalmente las proteínas solubilizadas se transfirieron a una placa de 96 pocillos donde se midió la absorbancia a 370 nm en un lector de placas.

Cálculos

La concentración de proteínas carboniladas plasmáticas se determinó mediante las ecuaciones 1 y 2.

$$\text{Proteínas carboniladas totales} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{ml}} \right) = \left[\frac{A_{370 \text{ nm}}}{\epsilon_{\text{DNPH}} \times b} \right] \times 10^6 \quad (1)$$

$$\begin{aligned} \text{Proteínas carboniladas totales} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mg proteína}} \right) \\ = \left[\frac{\text{Proteínas carboniladas totales} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{mL}} \right)}{\text{Contenido de proteínas de la muestra} \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right)} \right] \quad (2) \end{aligned}$$

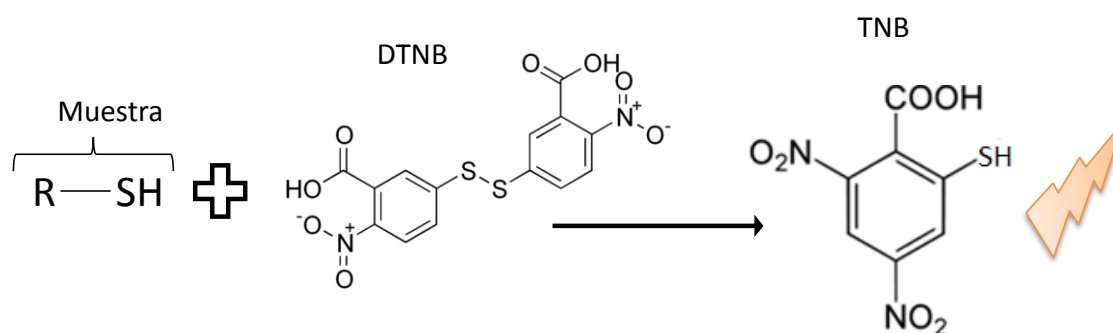
Dónde: $\epsilon_{\text{DNPH}} = 22\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, es el coeficiente de extinción del DNPH, $A_{370 \text{ nm}}$ es la absorbancia a 370 nm y b es el paso o altura del líquido en el pocillo.

3.6.3. Cuantificación de tioles totales

El contenido de tioles totales se cuantificó empleando el reactivo de Ellman (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico, DTNB). Los grupos tioles, presentes en las proteínas o en compuestos de bajo peso molecular, reaccionan con el DTNB y producen el ácido 3-nitrobenzoico (TNB) el cual puede ser cuantificado mediante absorbancia en un lector de placas a 412 nm en un espectrofotómetro.

La figura 7 corresponde a un esquema de la reacción del DTNB con los grupos tioles y la producción de TNB.

Figura 7. Reacción entre grupos tioles y DTNB.



DTNB, ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico; TNB, ácido 3-nitrobenzoico.

Protocolo experimental.

En una placa de 96 pocillos se cargaron 10 μL de disoluciones de glutatión reducido (GSH) como curva estándar (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM) y de plasma por duplicado. Como control negativo se cargó una mezcla de 10 μL de plasma y 200 μL de tampón fosfato (100mM, pH= 7.4). A continuación, se cargaron 200 μL de DNTB (0.5 mM en tampón fosfato) a cada pocillo con las muestras, excepto a los controles negativos. Se agitó la placa en un agitador durante 1 min y se incubó la mezcla a temperatura ambiente 30 minutos en oscuridad. Pasado este tiempo, se midió la absorbancia a 412 nm en un lector de placas Synergy HTTM.

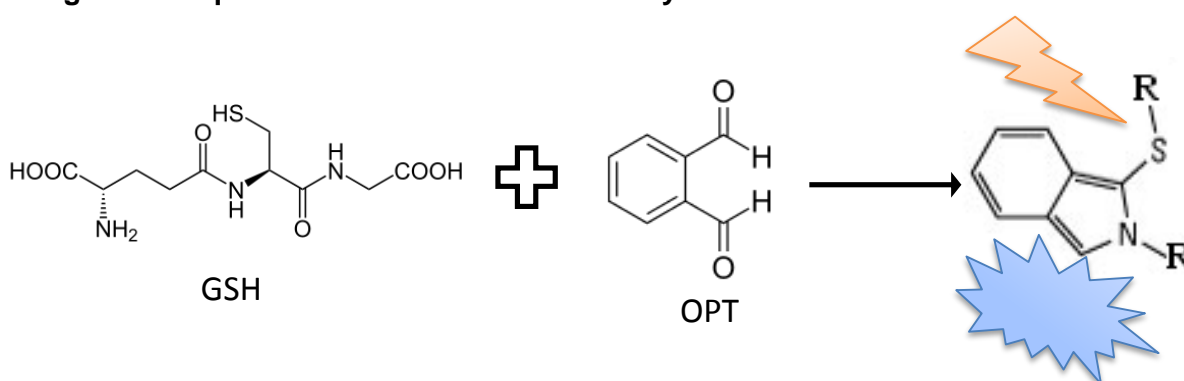
Cálculos

El nivel de tioles totales se expresó en mM GSH/mg de proteína, el cual se estimó a partir de la recta de calibrado del GSH y del contenido de proteína del plasma medido según el micro-método de Bradford descrito en la sección 3.8.1.

3.6.4. Cuantificación de glutatión reducido (GSH)

El nivel de GSH se cuantificó empleando un método espectro-fluorimétrico, basado en la reacción específica entre el o-ftalaldehído (OPT) y el GSH, que produce una intensa señal de fluorescencia (Hissin, Hilf 1976).

Figura 8. Esquema de la reacción entre GSH y OPT.



GSH, glutatión reducido; OPT, o-ftalaldehído.

Protocolo experimental.

Un volumen de 10 μL de plasma se mezcló con 12,5 μL de HPO_3 (25%) y 37 μL de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0). Esta mezcla se incubó a 4°C durante 10 minutos para favorecer la precipitación de proteínas plasmáticas. Seguidamente, el sobrenadante se separó mediante centrifugación a 2100 g x 20 minutos a 4°C.

A continuación en una placa multipocillo 10 μL del sobrenadante, adecuadamente diluido, se hizo reaccionar con 10 μL de OPT (0.1% p/v en metanol) y 180 μL de tampón fosfato (100 mM, 5 mM EDTA, pH=8.0) a temperatura ambiente durante 15 minutos y en ausencia de luz. La fluorescencia se midió en un lector de placa Synergy™ HT con λ excitación= 360 \pm 40 nm y λ emisión= 460 \pm 40 nm y una sensibilidad de 75.

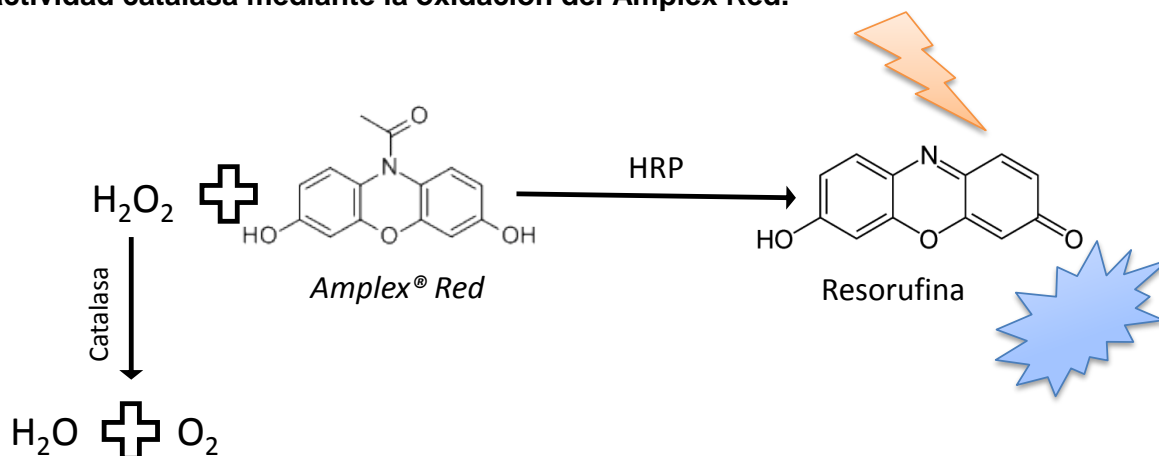
Cálculos

El nivel de GSH en las muestras, se expresó en μg GSH/mg de proteína, el cual se estimó a partir de la recta de calibrado de GSH preparado en el rango de 0-10 ng/ μL y del contenido de proteína del plasma (medido con el método de Bradford).

3.6.5. Determinación de la actividad catalasa

La actividad de la catalasa se cuantificó empleando el método fluorimétrico basado en la oxidación de la sonda Amplex Red producida por el H_2O_2 en presencia de HRP (enzima peroxidasa de rábano). La catalasa es capaz de catalizar la descomposición de H_2O_2 en H_2O y por tanto reducir la señal de fluorescencia (es decir, reduce la oxidación de la sonda). La señal de fluorescencia se leyó a una $\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25$ nm y una $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35$ nm en un lector de placas Synergy™

Figura 9. Esquema de las reacciones implicadas en la determinación de la actividad catalasa mediante la oxidación del Amplex Red.



HRP, enzima peroxidasa de rábano.

Protocolo experimental.

En una placa de 96 pocillos se cargó la recta patrón de catalasa (0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mM). Se mezclaron 25 μ L de plasma con un volumen igual de H_2O_2 y como control se cargaron 25 μ L de buffer 1X e igual volumen de H_2O_2 , todo ello se incubó a 37°C durante 15 minutos. Transcurrido ese tiempo, se añadieron 50 μ L de reactivo Amplex Red (AR-CAT), para medir la actividad catalasa en cada uno de los pocillos. Inmediatamente después, la placa se incubó a 37°C durante 30 minutos. Finalmente, se leyó la señal de fluorescencia ($\lambda_{excitación}=530\pm 25$ nm y $\lambda_{emisión}=590\pm 35$ nm) en un lector de placas.

Cálculos

La actividad catalasa plasmática se expresó en U/mg proteína, estimada a partir de la recta de calibrado de la catalasa según el protocolo experimental descrito. La recta estándar se obtuvo por análisis de regresión lineal de los datos de inhibición de la fluorescencia obtenida según la ecuación 2 frente la concentración de catalasa en U/mL. El contenido de proteína de las muestras de plasma se midió mediante el micro-método de Bradford descrito en la sección 3.8.1.

$$\text{inhibición de fluorescencia} = 1 - \frac{\text{Fluorescencia}_{\text{muestra/catalase}}}{\text{Fluorescencia}_{\text{blanco}}} \quad (1)$$

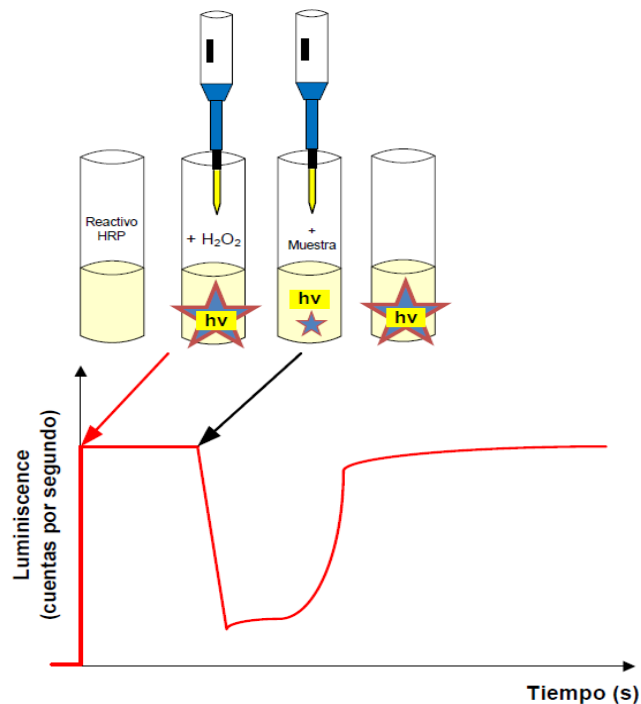
$$Fluorescencia_{Residual} = Fluorescencia_{Blanco} - Fluorescencia_{catalasa} \quad (2)$$

Donde: $Fluorescencia_{blanco}$ es la fluorescencia ($\lambda_{excitación} = 530 \pm 25$ nm y $\lambda_{emisión} = 590 \pm 35$ nm) en ausencia de catalasa.

3.6.6. Determinación de la capacidad antioxidante total. Método TAC (Total Antioxidant Capacity)

Este método se fundamenta en la inhibición de la reacción de luminiscencia del luminol catalizada por peroxidasa (HRP) en presencia de antioxidantes de bajo peso molecular presentes en el plasma. La rapidez de recuperación de la luminiscencia es inversamente proporcional a la concentración de antioxidantes no enzimáticos de la muestra (Saleh, Plieth 2010b). La señal de luminiscencia se midió en un luminómetro de tubos OPTOCOM 1 conectado a un ordenador.

Figura 10. Fundamento del método TAC de inhibición de la luminiscencia. Adaptado de Saleh et al., 2010.



Protocolo experimental.

El protocolo TAC comprende los siguientes pasos:

- 1) La adición de 50 μ L de H₂O₂, a igual volumen de HRP
- 2) Medición de la señal de luminiscencia cada 5 segundos durante 2 minutos, a efectos de alcanzar la máxima señal
- 3) Adición de 50 μ L de plasma (diluido 1:100)

- 4) Registro de la luminiscencia cada 5 segundos durante 500 segundos
La señal de luminiscencia se midió en un luminómetro individual de tubos OPTOCOM I, conectado a un ordenador

Cálculos

Los datos cinéticos de luminiscencia se transformaron a valores relativos haciendo uso de la siguiente ecuación:

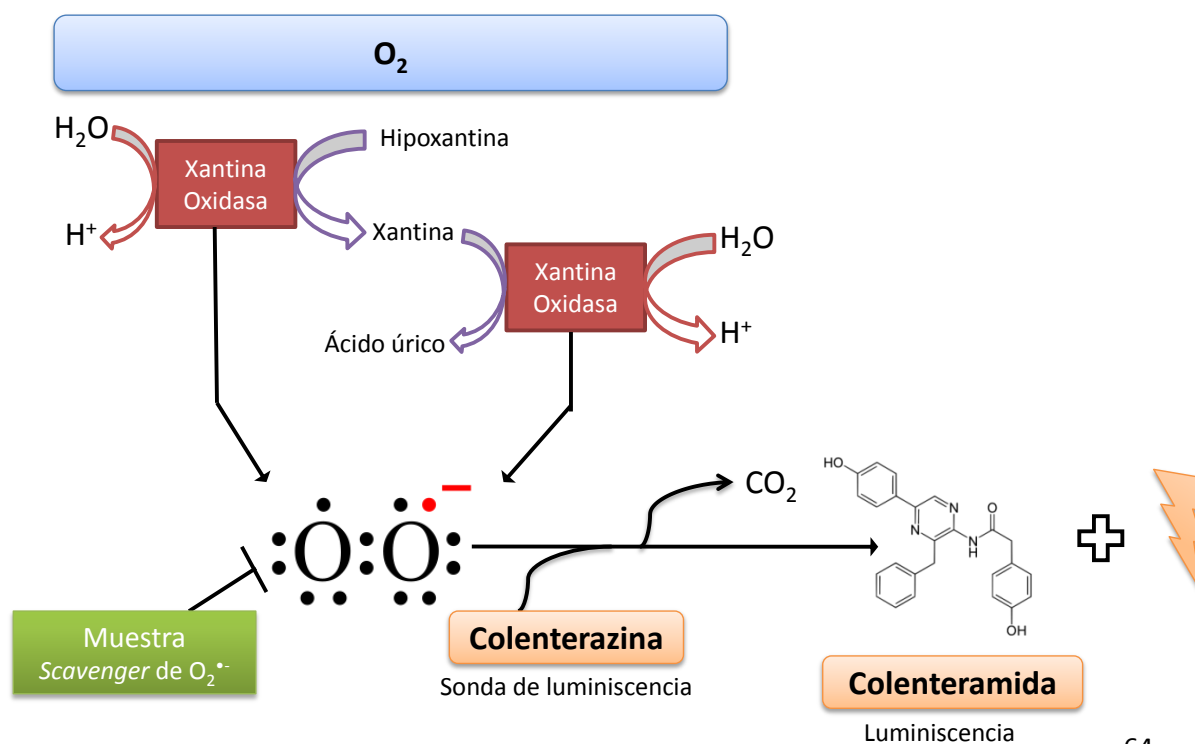
$$\text{Luminiscencia Relativa (LR)} = 1 - \frac{\text{Luminiscencia}_t}{\text{Luminiscencia}_{t=0}}$$

A partir de estos valores, se estimaron los valores del área bajo la curva (AUC), mediante el programa estadístico GraphPad Prisma Versión 5.

3.6.7. Determinación de la actividad SOD mediante el método SOSA (Superoxide Anion Scavenging Activity)

El método SOSA mide la capacidad de eliminar anión superóxido por los antioxidantes presentes en una muestra, utilizando coelenterazina (CTZ) como sonda de detección de anión superóxido. La CTZ es oxidada para producir un anión excitado, la coelenteramida (CTA), que emite luz azul. La inhibición de la luminiscencia es directamente proporcional a la cantidad de antioxidantes que contiene la muestra (Saleh, Plieth 2010a).

Figura 11. Esquema del mecanismo en el que se basa el método SOSA.



Protocolo experimental.

En primer lugar se adicionó la muestra/blanco/SOD seguido por la adición de la sonda de luminiscencia (CTZ), xantina oxidasa y finalmente el sustrato hipoxantina (Hx). Pasados 30 segundos de reacción a temperatura ambiente, se midió la señal de luminiscencia (luminómetro de placa GloMax). La reacción se llevó a cabo en tampón fosfato 100 mM, pH=7.4 (KPP), el cual se usó para disolver la SOD, diluir la muestra y la sonda de luminiscencia. Por otro lado, 0.1 mM EGTA en KPP y 0.4 % v/v Tritón (KPET) se utilizó para disolver la xantina oxidasa y la hipoxantina.

Cálculos

Los valores de luminiscencia de las muestras/SOD se convirtieron a valores de inhibición mediante la siguiente ecuación:

$$\text{inhibición de luminiscencia} = 1 - \frac{\text{Luminiscencia}_{\text{muestra/SOD}}}{\text{Luminiscencia}_{\text{blanco}}} \quad (1)$$

El valor de la SOSA se estimó a partir de la recta de calibrado de SOD (inhibición de luminiscencia frente log SOD) y se expresó en mU SOD/mg de proteína. El contenido de proteína de las muestras se midió mediante el método de Bradford.

3.6.8. Cálculo del parámetro Oxy-score

Se calculó un parámetro global de estatus oxidativo (Oxy-score) teniendo en cuenta el conjunto de antioxidantes determinados en plasma (SOD, catalasa, GSH, tioles y TAC) y los carbonilos como biomarcador de daño oxidativo, de acuerdo a la metodología previamente descrita (Veglia et al. 2010).

$$\text{Oxy - Score} = \Sigma \text{ antioxidantes} - \text{daño oxidativo}$$

La metodología incluye:

En primer lugar, se analizó la normalidad de los biomarcadores mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Aquellos biomarcadores que no siguieron una distribución normal se normalizaron mediante una transformación logarítmica. La normalidad de los parámetros transformados se constató mediante el análisis estadístico Kolmogorov-Smirnov. Como los parámetros tienen distintas

unidades, para poder realizar el sumatorio, el siguiente paso fue estandarizarlos mediante la siguiente ecuación:

$$Z_{ij} = \frac{X_{ij} - \mu_j}{\sigma_j}$$

Donde: Z_{ij} es el valor estandarizado del parámetro j del sujeto experimental i ; X_{ij} es el valor del parámetro j original o normalizado mediante transformación logarítmica; μ_j es el promedio del parámetro j y σ_j es la desviación estándar del parámetro j en los sujetos control.

Por último, el Oxy-Score se calculó como el valor promedio \pm desviación estándar para cada grupo experimental. El Σ antioxidantes se obtuvo a partir del promedio de los parámetros individuales.

Un Oxy-Score positivo indica prevalencia de capacidad antioxidante y un Oxy-Score negativo indica predominio de daño oxidativo.

3.7. Estudio de la expresión de proteínas mediante Western Blot

3.7.1. Procesamiento de las muestras de tejido cardiaco

El tejido cardiaco se pulverizó con ayuda de un mortero, utilizando nitrógeno líquido para mantenerlo congelado. El pulverizado obtenido se disolvió en tampón de lisis (0,42 mM NaCl, 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1mM ditioneitol (DTT), 20mM HEPES, 20mM NaF, 1mM Na_3VO_4 , 1mM EDTA, 1mM EGTA, 20% glicerol, 2mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 1 μ l/ml leupeptina, 1 μ l/ml aprotinina, y 0,5 μ l/ml N- α -tosil-l-lisina en clorometilcetona (TLCK)). El homogenado se sometió a cuatro choques térmicos consecutivos (congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño a 37°C). Posteriormente, se centrifugó durante 30 min a 10.000 rpm a 4°C y se recogió el sobrenadante.

En los sobrenadantes obtenidos se determinó la concentración de proteínas mediante Bradford y las muestras se conservaron a -20°C hasta la realización de los experimentos.

3.7.2. Detección de proteínas por Western Blot

En primer lugar, se hicieron ensayos preliminares para determinar la concentración óptima de carga de la muestra, que fue de 30 μ g/ μ L o 50 μ g/ μ L, en función del anticuerpo utilizado. En cada experimento las muestras se

ajustaron a la concentración óptima con reactivo Laemli (50 mM Tris, pH = 6.8), 10% glicerol, 10% dodecil sulfato sódico (SDS), 5% β -mercaptoetanol, 2mg/ml azul de bromofenol). A continuación las proteínas presentes en la muestra se separaron mediante electroforesis, utilizando un sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad, EE.UU.). Para ello, tras hervir la muestra en un baño a 100°C durante 5 min, ésta se cargó en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10, 12 o 15% de acrilamida en función del peso molecular de la proteína a detectar. Como marcador de pesos moleculares se utilizó Precision Plus Protein™, All blue standard (BIO-RAD, España).

La electroforesis se realizó a 90V al principio y después se sube el voltaje a 100 V durante unos 45 min, a temperatura ambiente y en tampón de electroforesis (0.2 M glicina; 0.025 M Tris y 0.1% SDS). A continuación, se llevó a cabo la transferencia de las proteínas del gel a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) a través de un sistema de transferencia a 25 V durante 7 min (Trans-Blot Turbo Transfer, Bio-Rad, EE.UU.).

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se lavaron 2 veces durante 5 min y otro lavado de 10 min en agitación, con una solución de lavado (0.1 % leche en polvo desnatada en tampón fosfato salino con 0.5% Tween 20 (PBS-T). Seguidamente, se incubaron durante 1h en agitación con una solución de bloqueo (5% leche en polvo desnatada en PBS-T), con el fin de evitar las uniones inespecíficas. A continuación, las membranas se lavaron de nuevo 2 veces durante 5 min y otro lavado de 10 min y se incubaron a 4°C durante 24h con el anticuerpo primario correspondiente, preparado en una solución específica (0.5% BSA, PBS-T y 0.05% azida).

Al día siguiente, las membranas se lavaron 3 veces con PBS-T durante 5 min y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente, en agitación, con el anticuerpo secundario correspondiente marcado con peroxidasa, que se preparó en una solución de leche en polvo desnatada al 1% en PBS-T. A continuación, se lavaron de nuevo 3 veces durante 5 min para eliminar los restos de anticuerpo secundario.

Por último, se llevó a cabo la detección de las distintas proteínas por quimioluminiscencia, incubando la membrana con el kit de detección (ECL Prime, Amersham Bioscience, Reino Unido) durante 1-5 min y posterior

exposición en un sistema de detección y adquisición de imagen ChemiDoc XRS (Bio-Rad, EE.UU.).

Sobre las mismas membranas se analizó la expresión de GADPH, que se utilizó como control de carga. La cuantificación de las bandas obtenidas se realizó mediante el programa informático Image Lab 3.0 (Bio-Rad, EE.UU.).

Determinación de la expresión de las proteínas productoras de anión superóxido: NADPH oxidasa y xantina oxidasa (XO). Para el análisis de las subunidades de la NADPH oxidasa p22^{phox} y p47^{phox} (22 y 47 KDa respectivamente) se utilizaron geles de acrilamida al 15 % [H₂O (2.4ml), 1.5M Tris-HCl pH=8,8 (2.5ml), 20% SDS (50µl); acrilamida/bisacrilamida al 30% (5ml), 10% amonio persulfato (50µl), TEMED (5 µl)]. Como anticuerpos primarios se utilizaron un anticuerpo policlonal de conejo contra la subunidad p22^{phox} (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Alemania), un anticuerpo primario policlonal de ratón contra la subunidad p47^{phox} (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Alemania). Como anticuerpos secundarios (Ig G) se utilizaron anticuerpos anti-conejo o anti-ratón dependiendo del anticuerpo primario, marcado con peroxidasa (1:5000, Amersham Bioscience, Reino Unido). En la misma membrana se determinó la expresión de gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH) como control de carga.

Para la determinación de la XO (150 KDa) se utilizó un gel de acrilamida al 12%. Las membranas se incubaron con un anticuerpo primario policlonal de conejo contra la proteína xantina oxidasa (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Alemania). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-conejo (1:5000, Amersham Bioscience, Reino Unido).

La cuantificación se llevó a cabo estableciéndose la relación entre la proteína a estudiar y el control de carga (GADPH). Los resultados se expresaron como porcentaje con respecto al grupo control.

Determinación de la expresión de enzimas antioxidantes: Cu/Zn SOD, Mn-SOD, Ec-SOD y catalasa. La expresión de las enzimas antioxidantes Cu/Zn-SOD (20-30 KDa), Mn-SOD (25 KDa), EC-SOD (monómero 30-35 KDa) y catalasa (60 KDa), se determinó utilizando geles de acrilamida al 15%.

Como anticuerpos primarios se utilizaron un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína Cu/Zn-SOD (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Alemania), un anticuerpo primario monoclonal de ratón contra la proteína Mn-SOD (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Alemania), un anticuerpo primario policlonal de conejo contra la proteína EC-SOD (1:1000, Enzo Life Sciences, EE.UU) y un anticuerpo primario monoclonal de ratón contra la proteína catalasa (1:2000, Sigma Aldrich, EE.UU). Como anticuerpos secundarios (IgG) anti-conejo (1:5000, Sigma-Aldrich), o anti-ratón (1:5000, Amersham Bioscience, Reino Unido), dependiendo del anticuerpo primario, marcados con peroxidasa.

La cuantificación se llevó a cabo estableciéndose la relación entre la proteína a estudiar y el control de carga (GADPH). Los resultados se expresaron como porcentaje con respecto al grupo control.

3.8. Estudio Ecocardiográfico

El estudio ecocardiográfico se realizó bajo sedación con ketamina (80 mg/kg) y diazepam (10 mg/kg), por vía intraperitoneal. Se colocó el animal en decúbito lateral izquierdo y se realizaron mediciones de tres latidos consecutivos.

Se utilizó un equipo (Acuson Sequoia C512) con un transductor de 13-MHz (Acuson, Mountain View, CA, USA). Las imágenes fueron adquiridas mediante la ecocardiografía transtorácica (ETT) en modo M, siguiendo las guías de la Sociedad Americana de Ecocardiografía (Sahn et al. 1978, Slama et al. 2005).

El registro del ecocardiograma en modo M se realizó desde la visión del eje corto del ventrículo izquierdo, justo por debajo de la válvula mitral.

En las imágenes capturadas se midieron los siguientes parámetros:

- DsVI: diámetro interno del ventrículo izquierdo al final de la sístole.
- DdVI: diámetro interno del ventrículo izquierdo al final de la diástole.
- PPd: pared posterior del ventrículo izquierdo.
- SIVd: septo interventricular.
- VS: volumen sistólico ventricular izquierdo.
- VD: volumen telediastólico ventricular izquierdo.

A partir de los parámetros anteriores se calculó la masa del ventrículo izquierdo (MVI), como parámetro de medida de la hipertrofia ventricular izquierda, así como la fracción de eyección, como medida de la función ventricular.

- **Masa del ventrículo izquierdo** (Devereux 1987).

$$MVI = 0.8 \cdot [1.04 \cdot (IVSd + LVIDd + PWd)^3 - LVIDd^3] + 0.6$$

- **Fracción de Eyección (%)** (Loch et al. 2009).

$$\text{Fracción de eyección (\%)} = \left[\frac{VD - VS}{VD} \right] \cdot 100$$

Donde:

$$VD = DdVI^3 \quad y \quad VS = DsVI^3$$

3.9. Análisis estadístico

Tamaño muestral. El tamaño muestral se calculó basándonos en la variabilidad de los datos. Respecto de los biomarcadores plasmáticos de estado oxidativo se tomó como referencia la variable grupos carbonilo, que por experiencia previa es el parámetro que presenta mayor variabilidad. En concreto se ha estimado que los valores de desviación estándar para este parámetro está entre 0,2 y 0,5 nmol/mg proteína. Para detectar diferencias significativas entre las medias de los grupos de aproximadamente 0,3 nmol/mg proteína, con una probabilidad de error tipo alfa del 5% y una potencia del 80%, el tamaño muestral necesario se ha calculado en un mínimo de 9 animales por cada grupo de comparación. En cuanto al estudio de parámetros hemodinámicos se requiere un tamaño muestral en torno a 7-8 ratas por grupo experimental. Para los estudios de Western Blot, se ha estimado un mínimo de 5 animales por grupo.

Los resultados obtenidos se expresaron como la media aritmética \pm el error estándar de la media aritmética (E.S). Las comparaciones de los resultados obtenidos entre grupos individuales se realizaron mediante el análisis de varianza de una vía (ANOVA *One-way*) o test de la *t* de Student y, para comparaciones múltiples, el test de Bonferroni. El análisis se llevó a cabo con el programa estadístico GraphPad Prism 5 (GraphPad software, CA, USA). Un valor $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS

1. Parámetros medidos en las ratas gestantes

1.1. Peso corporal

Durante la primera mitad de la gestación (dieta *ad libitum*) el incremento de peso corporal fue similar en ratas Control y ratas sometidas a restricción nutricional. Durante la segunda mitad de la gestación (restricción de la dieta al 50%) la ganancia de peso corporal fue menor en ratas con dieta restringida (Tabla 2).

Al final del periodo de lactancia, el peso corporal de las ratas con dieta control fue de (327.4±14.82 g; n=10) y el de las sometidas a dieta restringida fue de (334.0±10,69 g; n=10).

Durante el periodo de lactancia se observó una tendencia hacia una mayor ingesta de las ratas sometidas a desnutrición en comparación con el grupo C, siendo la ingesta significativamente mayor a día 10 postnatal (dieta control= 44.1±6.3 g, n=12; dieta restringida=60.4±3.4 g; n=12).

1.2. Valores plasmáticos de glucosa al final de la lactancia

Al destete, las ratas sometidas a restricción nutricional presentan niveles de glucemia significativamente mayores que los de las ratas control (Tabla 2).

Tabla 2. Incremento de peso durante la gestación y valores plasmáticos de glucosa al final de la lactancia.

	Dieta control	Dieta restringida
Δ Peso corporal	36.7± 4.4	35.4±3.7
1ª mitad gestación	(n=12)	(n=12)
Δ Peso corporal	97.5± 4.4	*39.0±5.8
2ª mitad gestación	(n=12)	(n=12)
Glucemia	99.36±4.66	*121.2±5.75
(mg/dl)	(n=11)	(n=11)

Δ Peso corporal, glucemia en ratas gestantes con dieta control y con dieta restringida. n= número de ratas; *p<0.05 comparado con control.

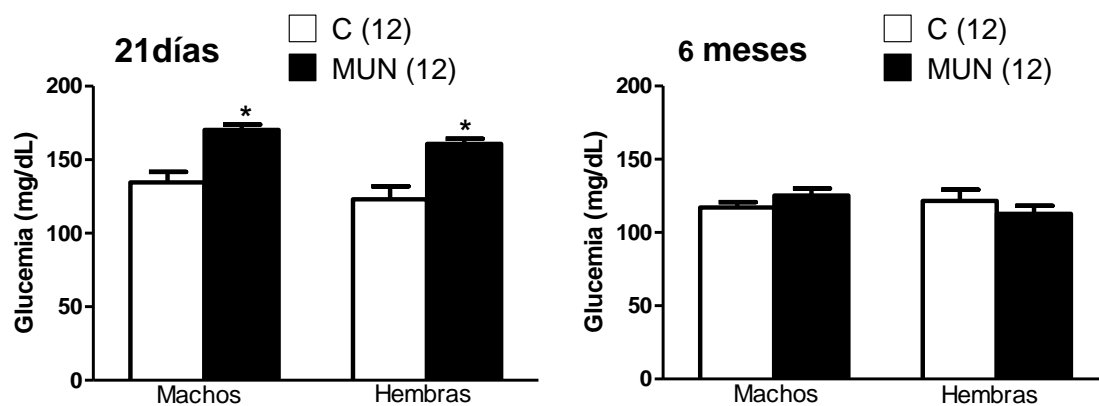
2. Parámetros medidos en las crías

2.1. Glucemia

A los 21 días de edad, la glucosa en sangre fue significativamente más elevada en descendientes MUN, respecto al grupo C, tanto en machos como en hembras. No hubo diferencias significativas entre machos y hembras de ambos grupos experimentales.

A los 6 meses de edad, no se observan diferencias significativas en los niveles de glucosa en sangre en ninguno de los grupos estudiados (Figura 12)

Figura 12. Glucemia en ratas Control y MUN a distintas edades.



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo.

2.2. Peso corporal

Al nacimiento (P1), los descendientes de ratas sometidas a restricción nutricional durante la gestación tuvieron un peso corporal menor (un 36% más pequeño) comparado con el grupo C, tanto en machos como en hembras.

A día postnatal 7 (P7), las ratas MUN muestran un peso corporal significativamente menor que las del grupo C. Las ratas MUN macho presentaban un peso 14% menor que las C y las ratas MUN hembra un 11% menor respecto a su grupo control.

A día postnatal 21 (P21), no se observaron diferencias significativas en el peso corporal de los animales del grupo MUN respecto al grupo C, tanto en machos

como en hembras. A esta edad tampoco hubo diferencias significativas entre machos y hembras en ninguno de los grupos experimentales.

A los 6 meses de edad (P6m), no existen diferencias significativas en el peso corporal entre el grupo control y el grupo MUN, ni en machos ni en hembras. A esta edad, las hembras de ambos grupos experimentales presentaron un peso corporal significativamente menor que los machos.

Los datos relativos a la evolución del peso corporal se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Peso corporal a distintas edades en ratas Control y MUN.

Peso corporal (g)	Machos C	Machos MUN	Hembras C	Hembras MUN
P1	6.48±0.13 (n=32)	*4.50±0.13 (n=27)	6.73±0.10 (n=30)	*4.72±0.09 (n=32)
P7	14.08±0.37 (n=18)	*11.35±0.43 (n=18)	§12.64±0.32 (n=24)	§*9.48±0.22 (n=15)
P21	51.33±1.52 (n=30)	50.60± 1.27 (n=32)	49.10± 1.34 (n=29)	46.92±1.16 (n=24)
P6m	504.5±15.17 (n=21)	491.2±8.62 (n=22)	§301.4±6.93 (n=15)	§287.1±4.71 (n=18)

C, control; MUN, desnutrición materna; n= número de ratas; P1, día postnatal 1; P7, día postnatal 7; P21, día postnatal 21; P6m, postnatal 6 meses; *p<0.05 comparado con el control del mismo sexo, § p<0.05 comparado con machos de la misma edad

2.3. Longitud de la tibia

A los 7 días de edad, la longitud de la tibia fue menor en los animales del grupo MUN respecto a su control, tanto en machos como en hembras.

A los 21 días de edad no se observan diferencias significativas en la longitud de la tibia, en los animales del grupo MUN respecto al grupo control, ni en machos ni en hembras.

A los 6 meses de edad, no se observan diferencias significativas en la longitud de la tibia en machos y hembras MUN respecto a sus respectivos controles. La longitud de la tibia fue menor en el caso de las hembras tanto MUN como control respecto a los machos.

Los datos relativos a la evolución de la longitud de la tibia se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Longitud de la tibia a distintas edades en ratas Control y MUN.

Longitud de la tibia (mm)	Machos	Machos	Hembras	Hembras
	C	MUN	C	MUN
P7	10.90±0.21 (n=10)	*10.07±0.16 (n=17)	10.60±0.19 (n=16)	§*9.53±0.19 (n=18)
P21	20.84±0.22 (n=24)	20.48±0.18 (n=23)	20.99±0.23 (n=27)	20.54±0.25 (n=32)
P6m	52.81±0.54 (n=8)	51.44±0.45 (n=5)	§45.53±1.72 (n=9)	§42.58±1.59 (n=9)

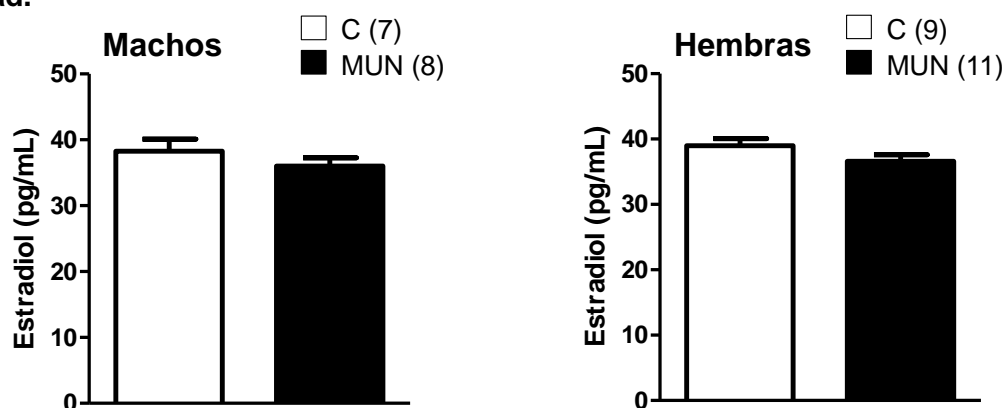
C, control; MUN, desnutrición materna; n= número de ratas; P7, día postnatal 7; P21, día postnatal 21; P6m, postnatal 6 meses; *p<0.05 comparado con el control del mismo sexo, § p<0.05 comparado con machos de la misma edad.

2.4. Hormonas sexuales

Con objeto de determinar si las ratas a los 21 días de edad se encuentran en la etapa prepuberal, se determinaron las concentraciones plasmáticas de estradiol y testosterona, en machos y hembras.

A P21, se observó que los niveles de estradiol en plasma son similares en machos y hembras, tanto en el grupo MUN como en el grupo control.

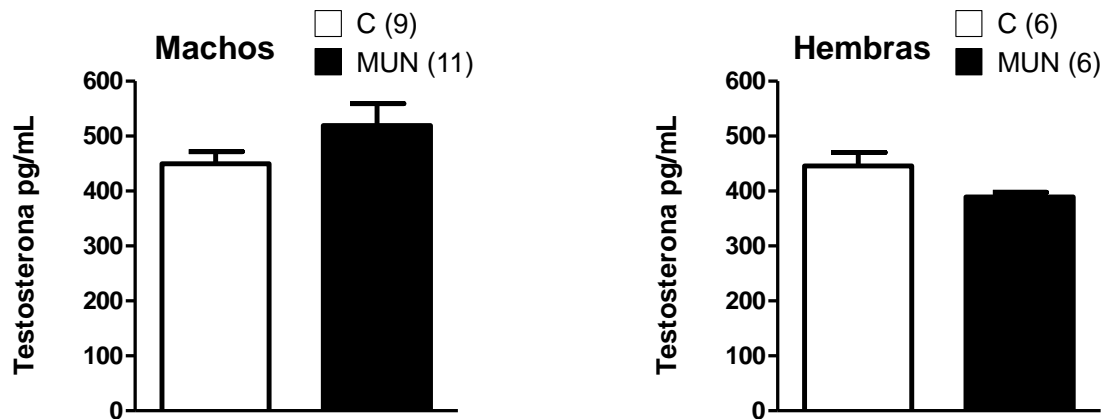
Figura 13. Niveles de estradiol en plasma en ratas Control y MUN a los 21 días de edad.



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales.

A P21, los niveles de testosterona en plasma presentan una tendencia a ser mayores en el grupo MUN machos que en el grupo control, si bien la diferencia no fue estadísticamente significativa. En el caso de las hembras, las MUN tienen niveles algo menores que su control, pero tampoco existen diferencias significativas entre los grupos.

Figura 14. Niveles de testosterona en plasma en ratas Control y MUN a los 21 días de edad.



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales.

2.5. Peso y morfología cardíaca

Peso del corazón.

El peso del corazón se relativizó tanto en función del peso corporal como en función de la longitud de la tibia, encontrándose los mismos resultados relativizando de una u otra manera.

A P7, no se observa un aumento del peso relativo del corazón en ratas MUN respecto al control, ni en machos ni en hembras.

A P21 se observó un aumento significativo del peso relativo del corazón en machos MUN respecto a sus controles, no encontrándose diferencias significativas entre las hembras MUN y control.

A los 6 meses de edad no se observan diferencias significativas en el peso relativo de ratas MUN con respecto al control, ni en machos ni en hembras.

Los datos del peso relativo del corazón se muestran en la Tablas 5 y 6.

Tabla 5. Peso corazón/peso corporal a distintas edades en ratas Control y MUN.

Peso _{corazón} /Peso _{corporal} (g/g)	Machos	Machos	Hembras	Hembras
	C	MUN	C	MUN
P7	0.0063±0.0001 (n=11)	0.0067±0.0002 (n=11)	0.0062±0.0001 (n=25)	0.0065±0.0001 (n=13)
P21	0.0051±0.0001 (n=25)	*0.0059±0.0001 (n=22)	0.005±0.0005 (n=12)	0.005±0.001 (n=17)
P6m	0.0027±0.0001 (n=14)	0.0028±0.0002 (n=14)	0.0030±0.0002 (n=13)	0.0031±0.0002 (n=16)

C, control; MUN, desnutrición materna; n= número de ratas; P7, día postnatal 7; P21, día postnatal 21; P6m, postnatal 6 meses; *p<0.05 comparado con el control del mismo sexo.

Tabla 6. Peso corazón/longitud de la tibia a distintas edades en ratas Control y MUN.

Peso _{corazón} /Longitud _{tibia} (g/mm)	Machos	Machos	Hembras	Hembras
	control	MUN	control	MUN
P7	0.007±0.0008 (n=11)	0.008±0.0001 (n=11)	0.006±0.0009 (n=15)	0.007±0.0006 (n=13)
P21	0.012±0.0011 (n=15)	*0.014±0.0037 (n=15)	0.011±0.001 (n=16)	0.012±0.0029 (n=28)
P6m	0.030±0.0031 (n=12)	0.030±0.0041 (n=14)	0.021±0.003 (n=13)	0.021±0.0028 (n=17)

C, control; MUN, desnutrición materna; n= número de ratas; P7, día postnatal 7; P21, día postnatal 21; P6m, postnatal 6 meses; *p<0.05 comparado con el control del mismo sexo.

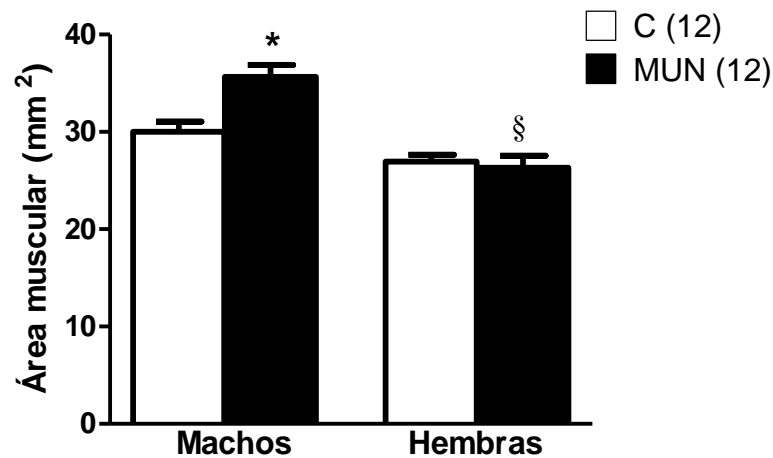
Área muscular ventricular (tinción PAS)

Para comprobar la existencia de hipertrofia ventricular, se realizó un estudio histológico en secciones de corazón en ratas MUN y control a los 21 días de edad.

Los corazones de ratas MUN macho presentan un área muscular ventricular significativamente mayor que los del grupo Control. No se observan diferencias significativas entre las hembras control y MUN. Las ratas MUN hembra

presentaron un área ventricular significativamente menor que las ratas MUN macho.

Figura 15. Área muscular ventricular a los 21 días de edad.



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. § $p < 0.05$ comparado con machos de la misma edad.

2.6. Parámetros hemodinámicos a los 21 días y 6 meses de edad

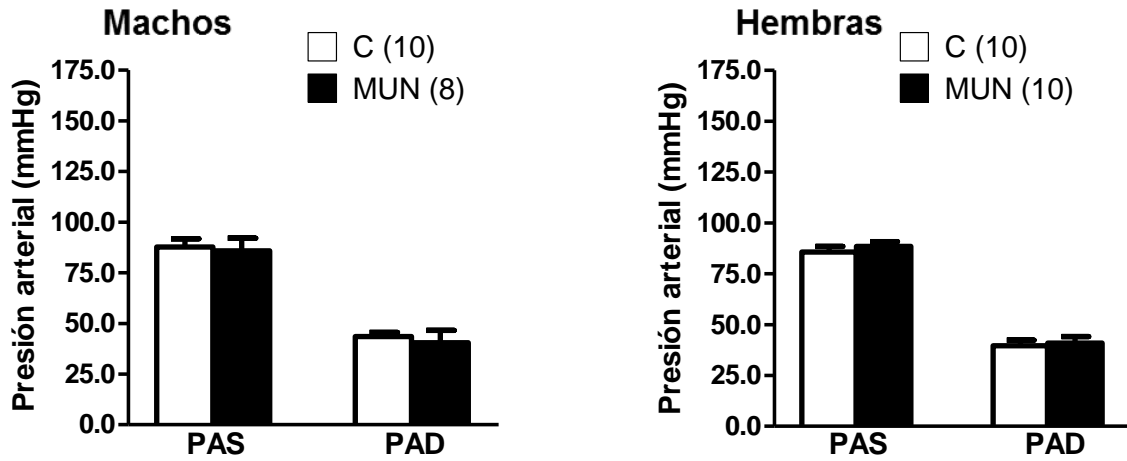
2.6.1 Presión arterial

A los 21 días de edad no se observan diferencias significativas en los valores de presión arterial sistólica ni de presión arterial diastólica (PAS, PAD) entre las ratas Control y MUN, ni en machos ni en hembras (Figura 16A).

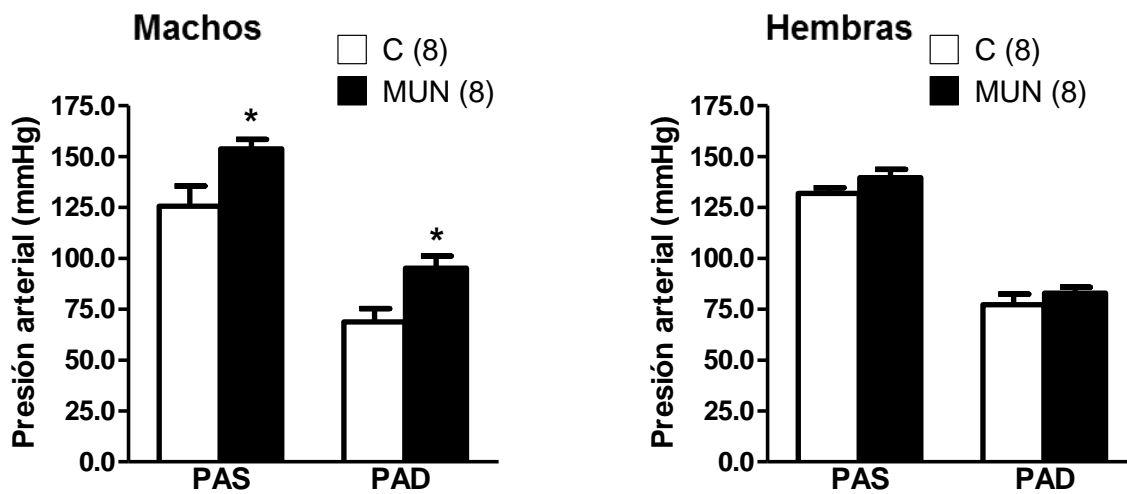
A los 6 meses de edad, los machos MUN presentan valores de PAS y PAD significativamente mayores en comparación con el grupo Control. No se observan diferencias significativas en la PAS y PAD de las ratas MUN hembra comparado con las controles (Figura 16B).

Figura 16. Presión arterial sistólica y diastólica en ratas MUN y Control a distintas edades.

A) 21 días



B) 6 meses



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional; PAS, presión arterial sistólica; PAD, presión arterial diastólica. Entre paréntesis número de animales, *p<0.05 respecto al control del mismo sexo.

2.6.2 Frecuencia cardiaca

No hubo diferencias significativas en los valores de frecuencia cardiaca entre grupos experimentales a 21 días ni a 6 meses de edad (Tabla 7).

Tabla 7. Frecuencia cardiaca a distintas edades en ratas Control y MUN

Frecuencia cardiaca	Machos C	Machos MUN	Hembras C	Hembras MUN
P21	308.3±26.10 (n=11)	319.9±18.75 (n=7)	311.5±19.75 (n=8)	326.5±18.31 (n=10)
P6m	258.4±26.51 (n=7)	247.8±35.98 (n=8)	222.6±35.43 (n=7)	220.7±30.90 (n=11)

C, control; MUN, desnutrición materna; n= número de ratas; P21, postnatal 21; P6m, postnatal 6 meses.

2.7. Estatus oxidativo plasmático a los 21 días y 6 meses de edad

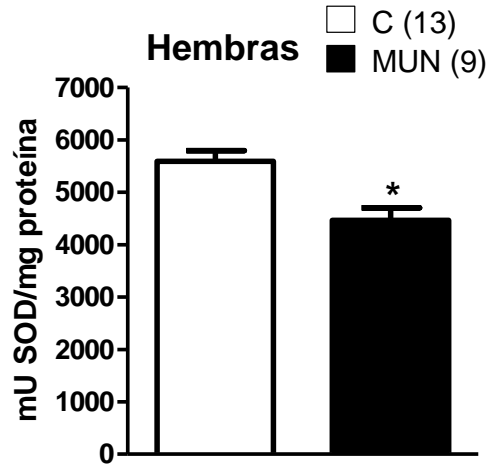
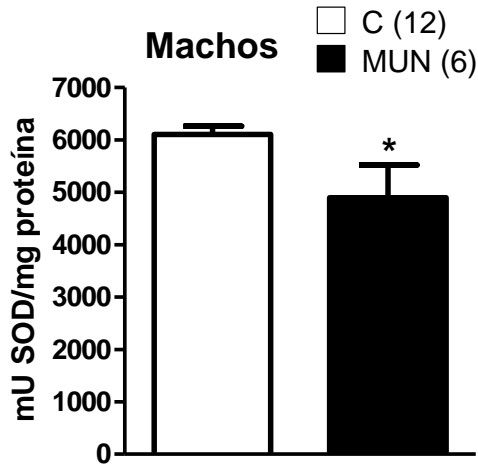
2.7.1. Estatus oxidativo en ratas de 21 días de edad

Actividad antioxidante total (TAC). No hubo diferencias estadísticamente significativas en el parámetro TAC entre ratas macho MUN y control (C=342.3±8.0 AUC, n=11; MUN=348.7±16.8 AUC, n=9). Tampoco se encontraron diferencias entre las hembras MUN y control (C=328.5±6.3 AUC, n=12; MUN=352.9±10.3 AUC; n=12).

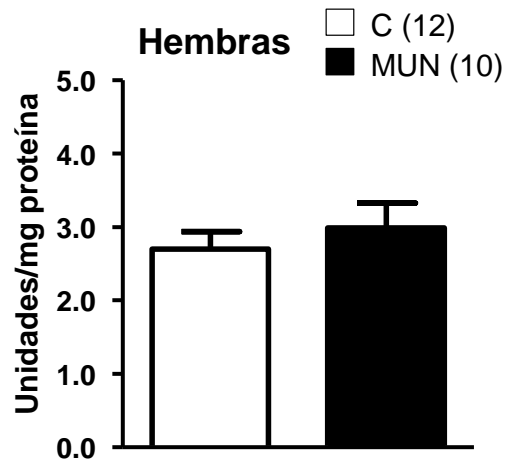
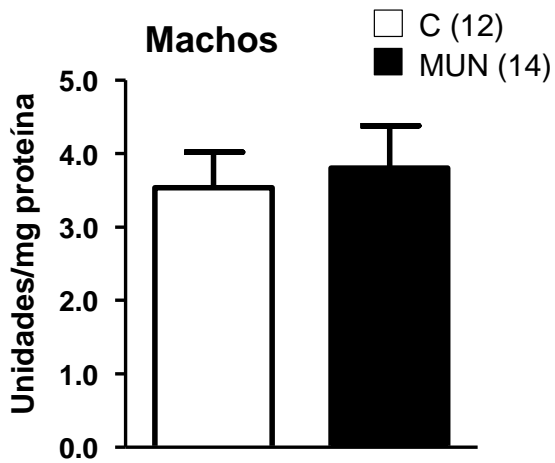
Actividad de SOD y actividad catalasa. La actividad SOD, estimada mediante el parámetro SOSA, fue significativamente menor en ratas MUN respecto a las ratas control, tanto en machos como en hembras. No se observaron diferencias significativas en la actividad catalasa de los grupos control y MUN tanto en machos como en hembras (Figura 17).

Figura 17. Actividad SOD y catalasa en ratas MUN y control a los 21 días de edad.

A) Actividad SOD



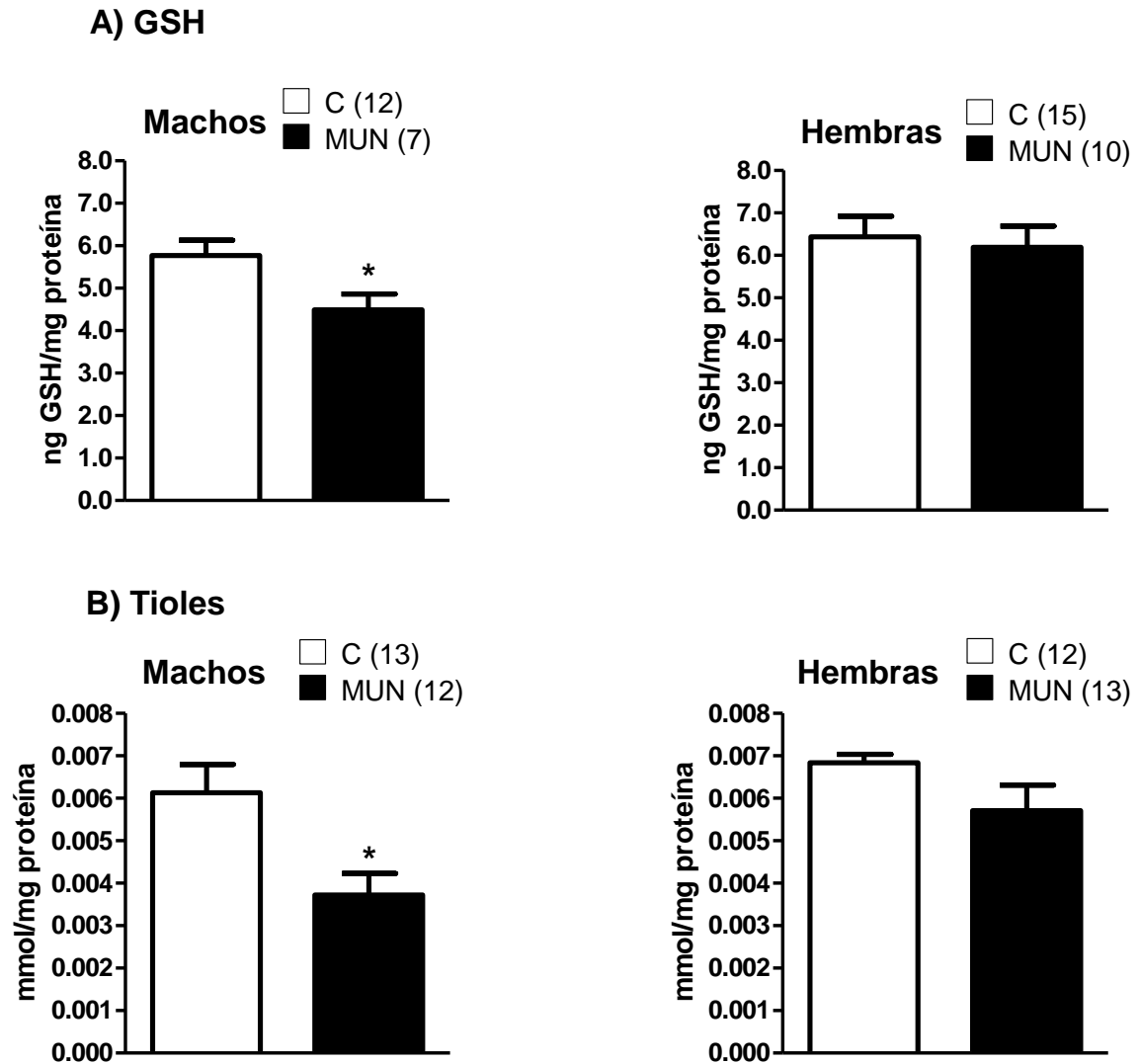
B) Actividad catalasa



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo.

Concentración plasmática de GSH y tioles totales. En ratas macho los niveles de tioles totales y de GSH fueron significativamente menores en el grupo MUN comparado con el grupo control. Sin embargo, en las ratas hembras no hubo diferencias significativas entre MUN y control (Figura 18).

Figura 18. Niveles de GSH y tioles a los 21 días de edad en ratas MUN y control.

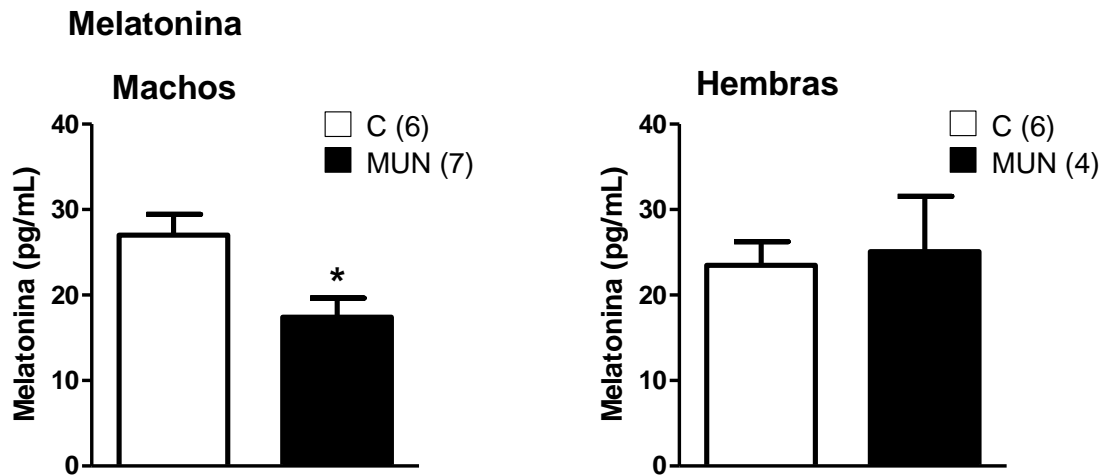


C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo.

Concentración de melatonina. Los niveles de melatonina se midieron en ratas de 36 días de edad, tras el cambio de ciclo luz/oscuridad durante 15 días.

En ratas MUN macho los niveles de melatonina fueron significativamente menores respecto al grupo control. Sin embargo, en las ratas hembra no hubo diferencias significativas entre MUN y control (Figura 19).

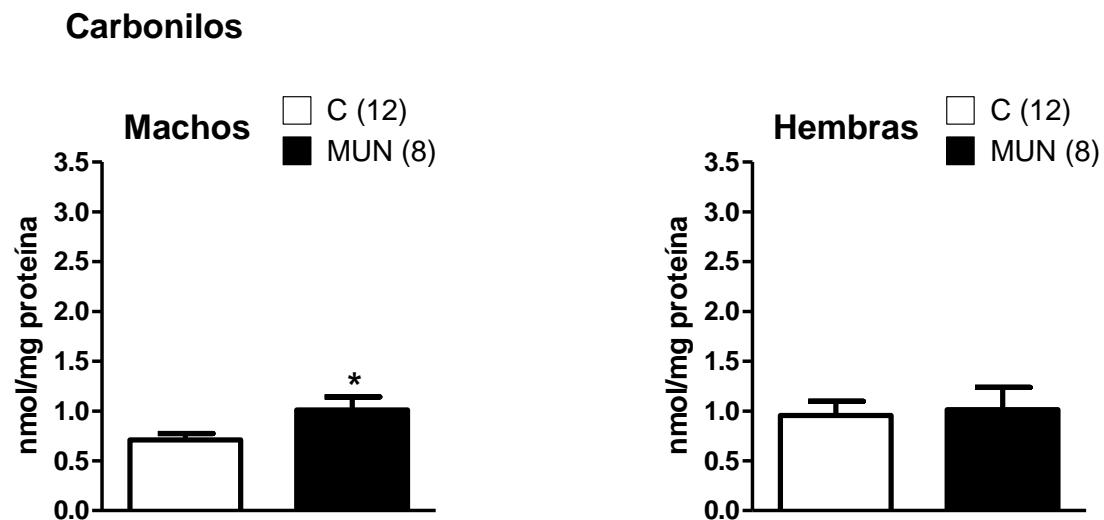
Figura 19. Niveles de melatonina a los 36 días de edad en ratas MUN y control.



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo.

Concentración plasmática de carbonilos totales. A los 21 días de edad las ratas MUN macho presentan niveles de carbonilos significativamente mayores que los de las ratas macho Control (un 42% mayor). En ratas hembra no hubo diferencias significativas entre MUN y control (Figura 20).

Figura 20. Niveles de carbonilos a los 21 días de edad en ratas MUN y control.

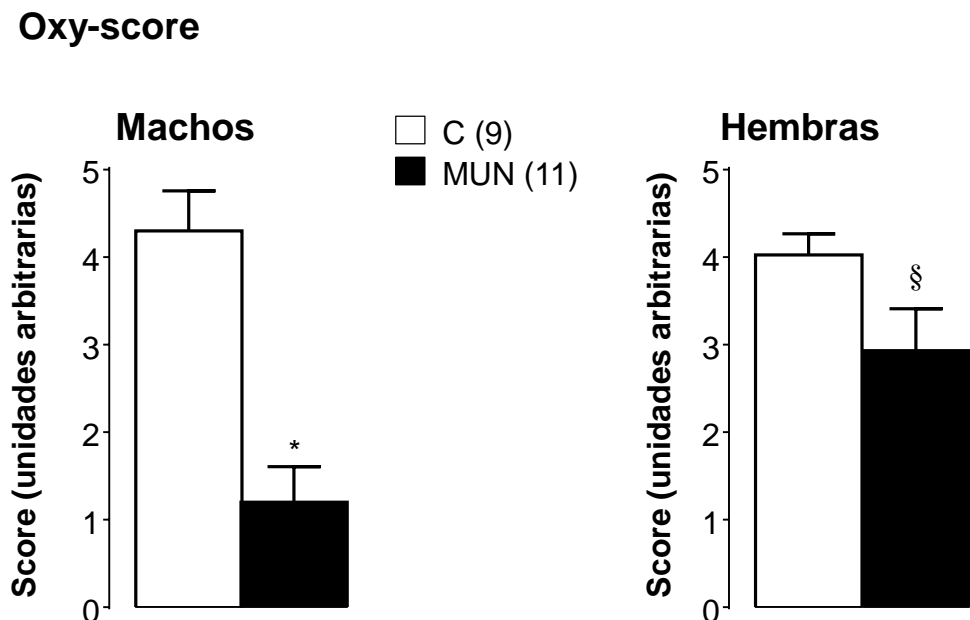


C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo.

Estado oxidativo global. A los 21 días de edad el estado oxidativo global, determinado mediante el parámetro Oxy-score, fue positivo en las ratas de ambos grupos experimentales. Este hecho indica que predominan los antioxidantes sobre el daño oxidativo.

A esta edad, las ratas MUN macho tuvieron un Oxy-score significativamente menor que las ratas control, mientras que en las hembras no hubo diferencias significativas entre ambos grupos experimentales. Las hembras MUN presentaron valores de Oxy-score significativamente mayores que los machos MUN.

Figura 21. Oxy-score a los 21 días de edad en ratas MUN y control.



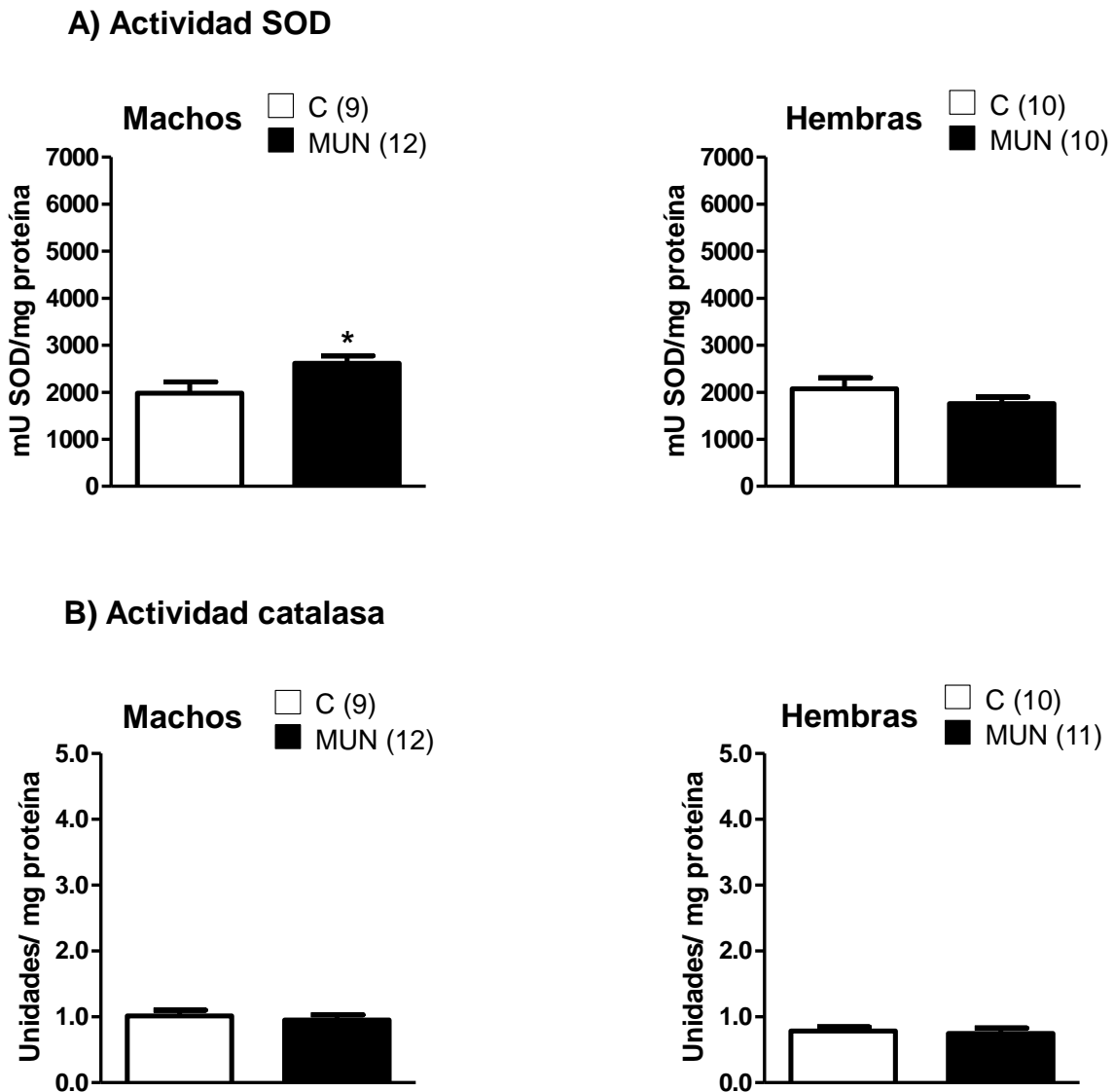
C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, *p<0.05 respecto al control del mismo sexo. §p<0.05 comparado con machos de la misma edad.

2.7.2. Estatus oxidativo en ratas de 6 meses de edad

Actividad antioxidante total (TAC). No hubo diferencias estadísticamente significativas en la actividad antioxidante total (TAC) entre ratas machos MUN y control (C=269.9±35.4 AUC, n=5; MUN=304.5±30.2 AUC, n=5). Tampoco hubo diferencias significativas entre las hembras de ambos grupos experimentales (C=283.9±46.8 AUC, n=5; MUN=323.4±49.3 AUC, n=5).

Actividad de SOD y catalasa. La actividad SOD, estimada mediante el parámetro SOSA, fue significativamente mayor en ratas MUN macho, con respecto a su control. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en ratas hembra. Tampoco hubo diferencias en la actividad catalasa entre MUN y control, tanto en machos como en hembras (Figura 22).

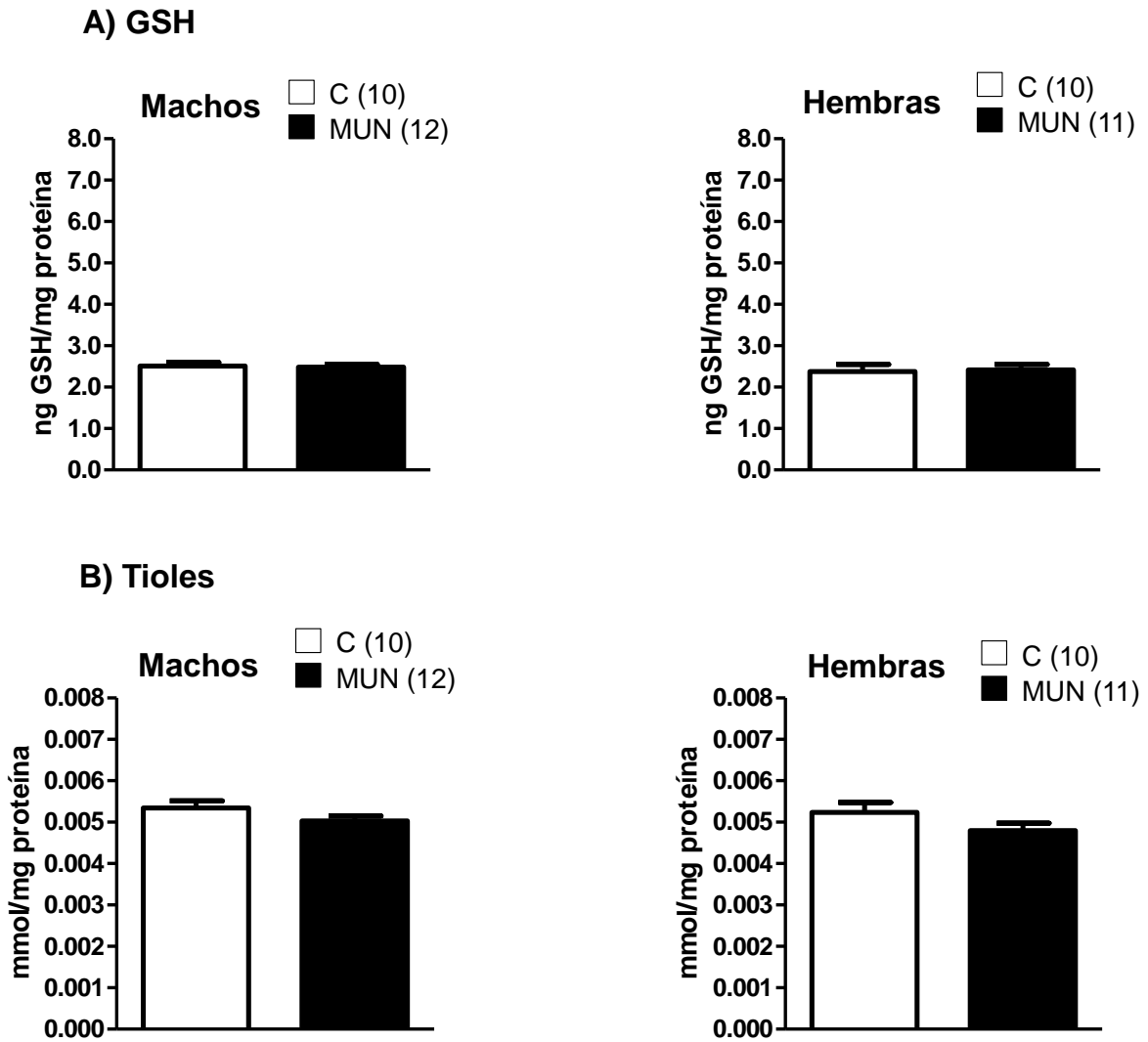
Figura 22. Actividad SOD y catalasa en ratas MUN y control a los 6 meses de edad.



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo.

Concentraciones plasmáticas de GSH y tioles totales. Los niveles de tioles totales y de GSH no fueron significativamente distintos entre ratas MUN y control, ni en machos ni en hembras (Figura 23).

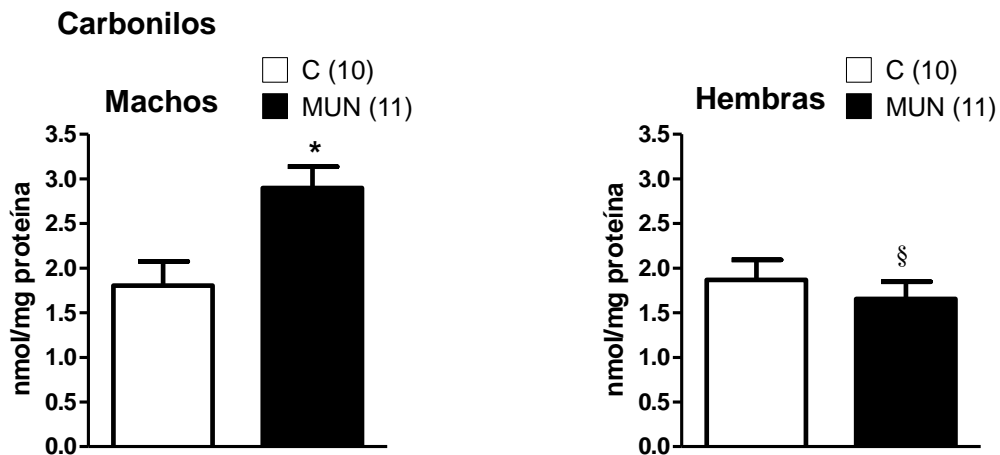
Figura 23. GSH y tioles en ratas MUN y control a los 6 meses de edad.



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales.

Concentraciones plasmáticas de carbonilos totales. A los 6 meses de edad en ratas MUN macho los niveles de carbonilos fueron significativamente mayores que los de ratas control (un 60% mayor). Las hembras MUN y control no presentaron diferencias significativas entre sí. Las hembras MUN presentaron niveles significativamente menores que los machos MUN (Figura 24).

Figura 24. Carbonilos totales en ratas MUN y control a los 6 meses de edad.

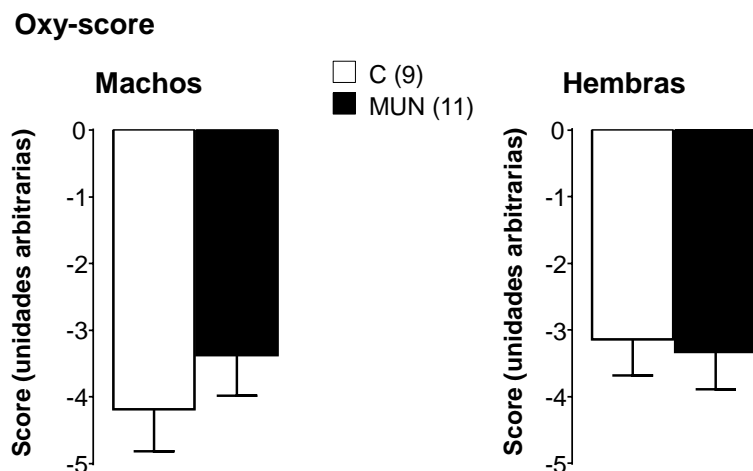


C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. § $p < 0.05$ comparado con machos de la misma edad.

Estado oxidativo global. A los 6 meses de edad, el parámetro Oxy-score fue negativo tanto en machos como en hembras, lo que indica que predomina el daño oxidativo frente a los antioxidantes.

Las ratas MUN adultas, tanto machos como hembras, no muestran diferencias significativas de Oxy-score comparado con su respectivo control.

Figura 25. Oxy-score a los 6 meses de edad en ratas MUN y control.



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales.

2.8. Expresión de enzimas de estatus oxidativo en corazón a los 21 días de edad

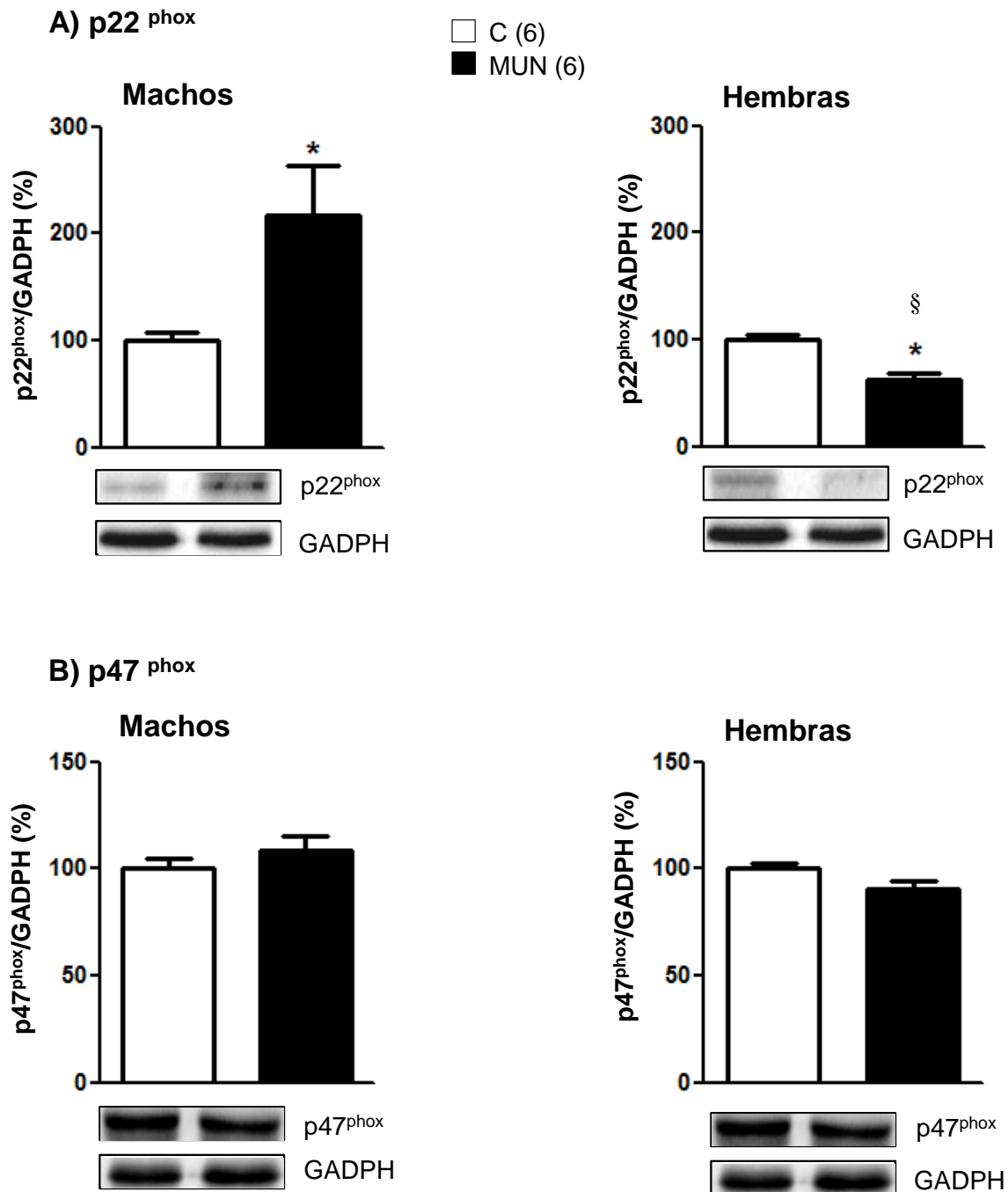
2.8.1. *Enzimas implicadas en la producción de radicales libres*

NADPH oxidasa. Se determinó la expresión de las subunidades p22^{phox} y p47^{phox}.

La expresión de p22^{phox} fue significativamente mayor en machos MUN respecto a su control. Las hembras MUN presentaron una menor expresión de la subunidad p22^{phox} respecto a su control (Figura 26A).

La expresión de p47^{phox} fue similar en ambos grupos experimentales, no existiendo diferencias en ninguno de los grupos estudiados (Figura 26B).

Figura 26. Expresión de las subunidades p22^{phox} y p47^{phox} de la NADPH oxidasa en ratas control y MUN a los 21 días de edad.

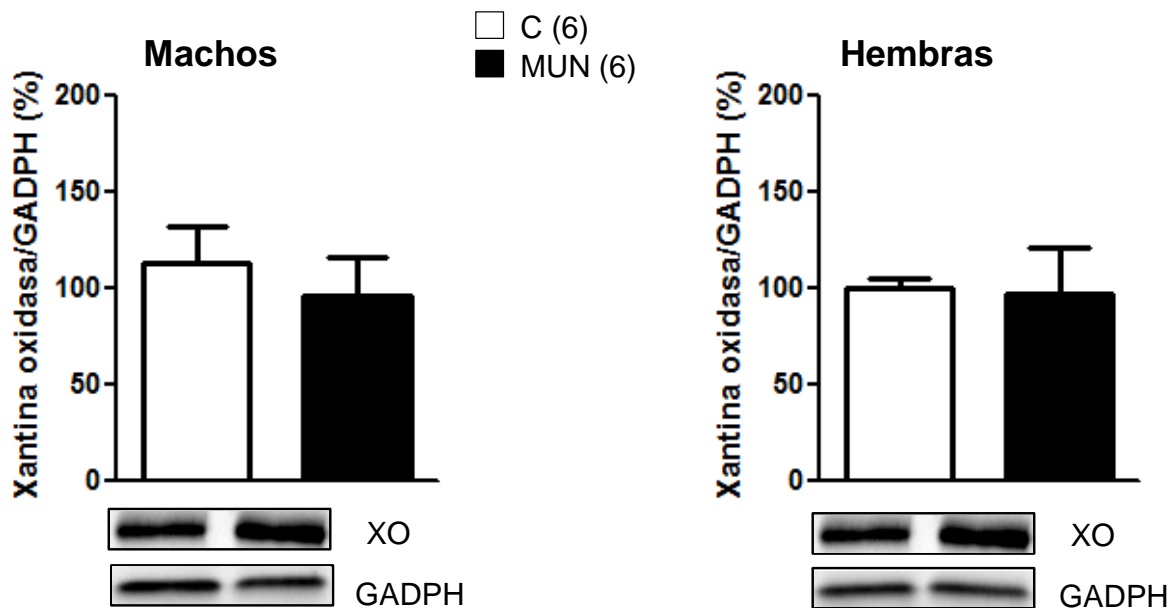


Expresión de la subunidad p22^{phox} (A) y p47^{phox} (B) de la NADPH oxidasa. Los datos se relativizaron frente a la proteína GADPH y se expresaron en porcentaje respecto del control. C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Cada resultado representa la media \pm error estándar. Entre paréntesis número de animales; * $p < 0.05$ respecto al grupo control; § $p < 0.05$ respecto a machos MUN. Se incluyen blots representativos de cada proteína.

Xantina oxidasa. A los 21 días de edad, la expresión de XO fue similar en ambos grupos experimentales, tanto en machos como en hembras (Figura 27).

Figura 27. Expresión de xantina oxidasa en ratas control y MUN a los 21 días de edad.

Xantina oxidasa

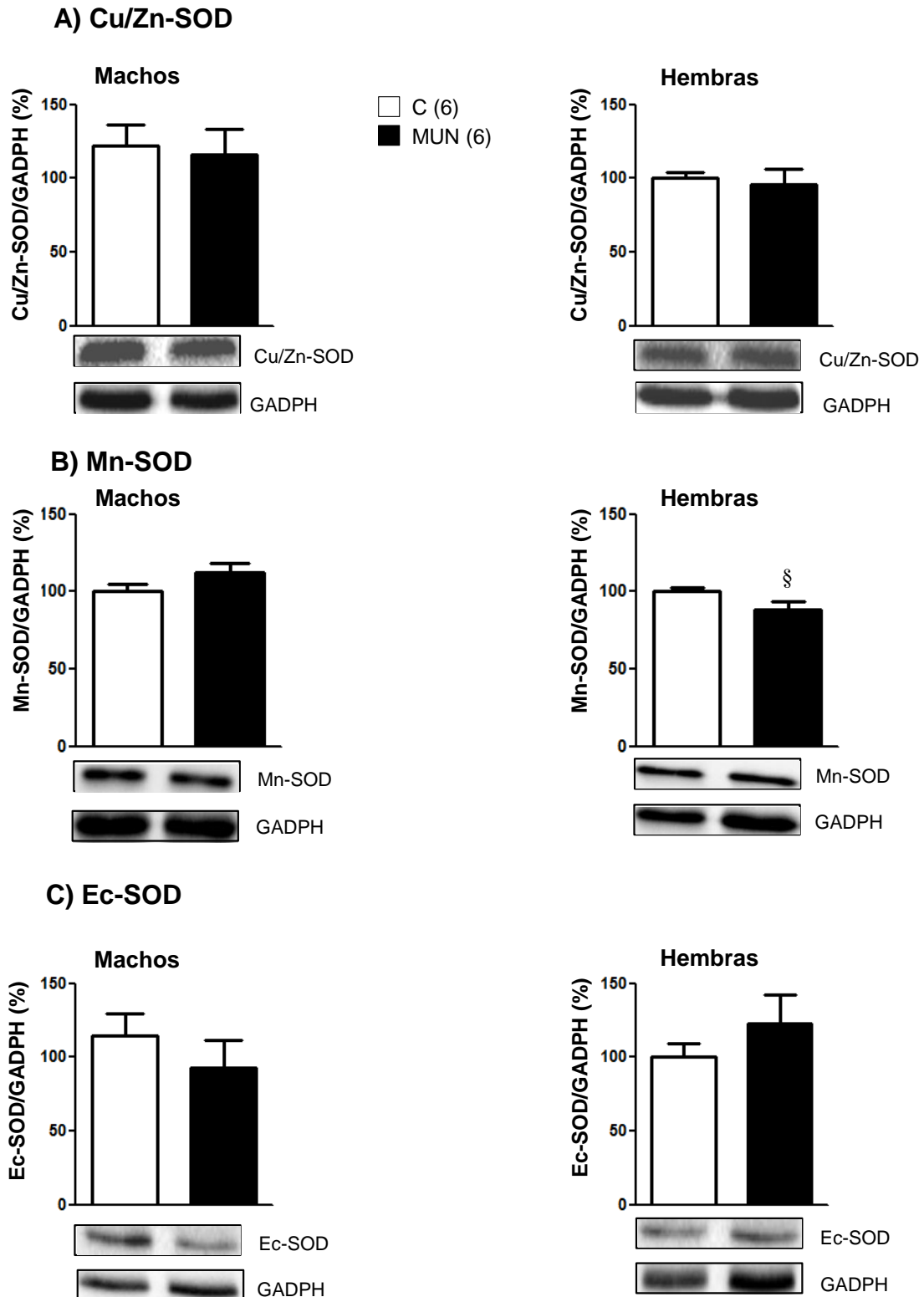


Expresión de Xantina oxidasa (XO). Los datos se relativizaron frente a la proteína GADPH y se expresaron en porcentaje respecto del control. C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Cada resultado representa la media \pm error estándar. Entre paréntesis número de animales. Se incluyen blots representativos de cada proteína.

2.8.2. Enzimas implicadas en la eliminación de radicales libres

Superóxido dismutasas: Se determinó la expresión de las isoformas Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Ec-SOD. A los 21 días de edad, no se observaron diferencias significativas entre MUN y control en ninguna de las isoformas, tanto en machos como en hembras.

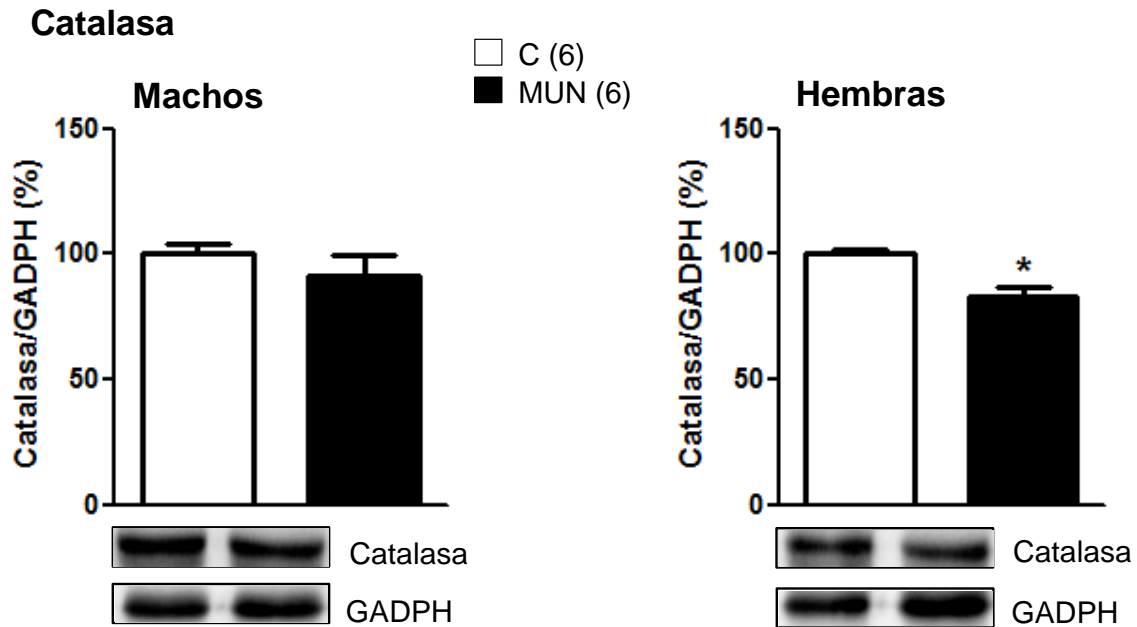
Figura 28. Expresión de las distintas isoformas de SOD en ratas MUN y control a los 21 días de edad.



Expresión de Cu/Zn-SOD (A), Mn-SOD (B) y Ec-SOD (C). Los datos se relativizaron frente a la proteína GADPH y se expresaron en porcentaje respecto del control. C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Cada resultado representa la media \pm error estándar. Entre paréntesis número de animales; [§]p<0.05 respecto a machos MUN. Se incluyen blots representativos de cada proteína.

Catalasa. No se observaron diferencias significativas en la expresión de catalasa en machos MUN con respecto a su control. Las hembras MUN presentaron una menor expresión de catalasa respecto a su control (Figura 29).

Figura 29. Expresión de catalasa en ratas MUN y control a los 21 días de edad.



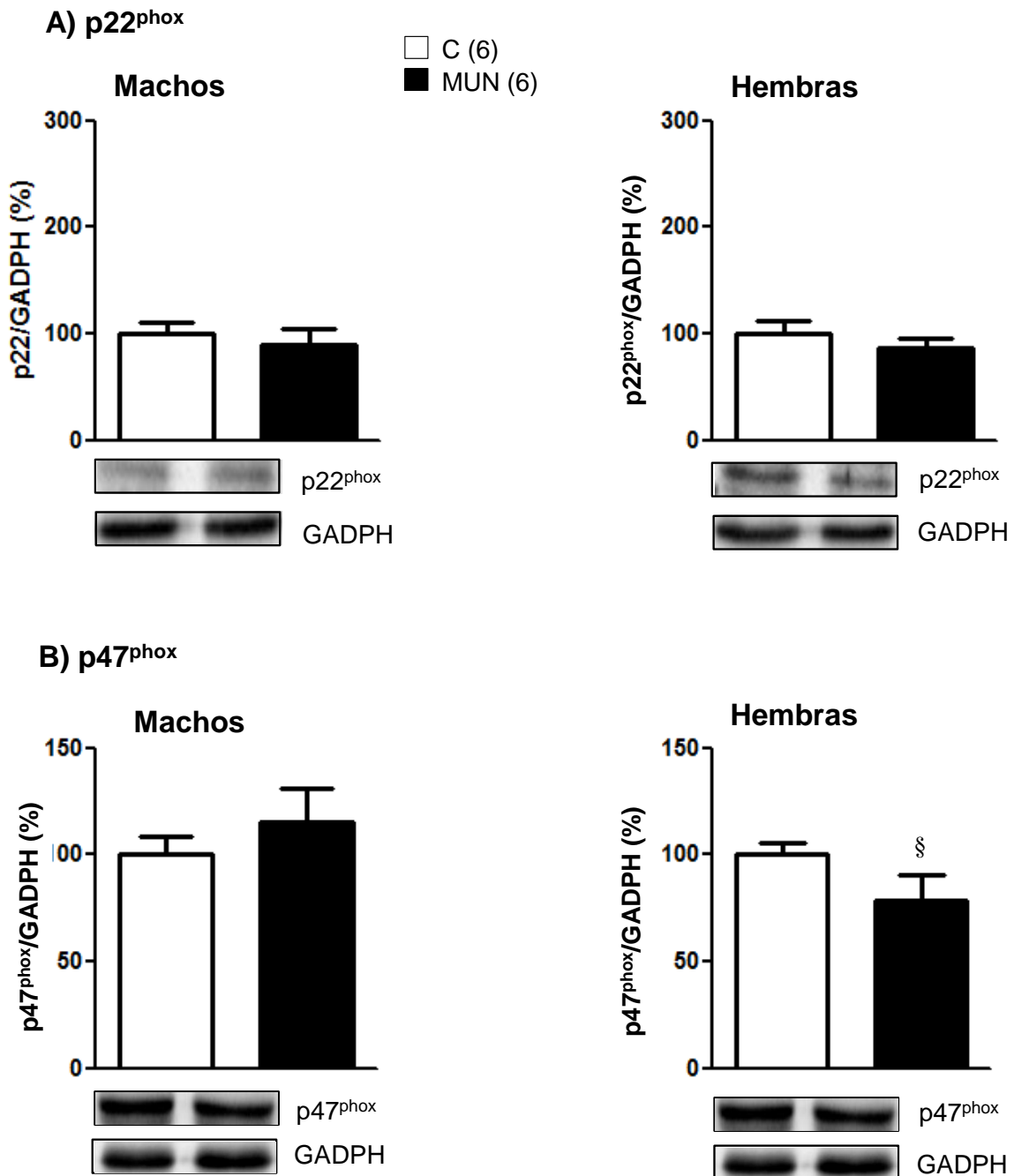
Expresión de catalasa. Los datos se relativizaron frente a la proteína GADPH y se expresaron en porcentaje respecto del control. C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Cada resultado representa la media \pm error estándar. Entre paréntesis número de animales; * $p < 0.05$ respecto al grupo control. Se incluyen blots representativos de cada proteína.

2.9. Expresión de enzimas de estatus oxidativo en corazón a los 6 meses de edad

2.9.1 Enzimas implicadas en la producción de radicales libres

NADPH oxidasa. A los 6 meses de edad, no se encontró diferencia significativa en la expresión de $p22^{phox}$ ni de $p47^{phox}$ entre ratas MUN y control, tanto en machos como en hembras. Las hembras MUN presentaron una expresión de $p47^{phox}$ significativamente menor en comparación con los machos MUN (Figura 30).

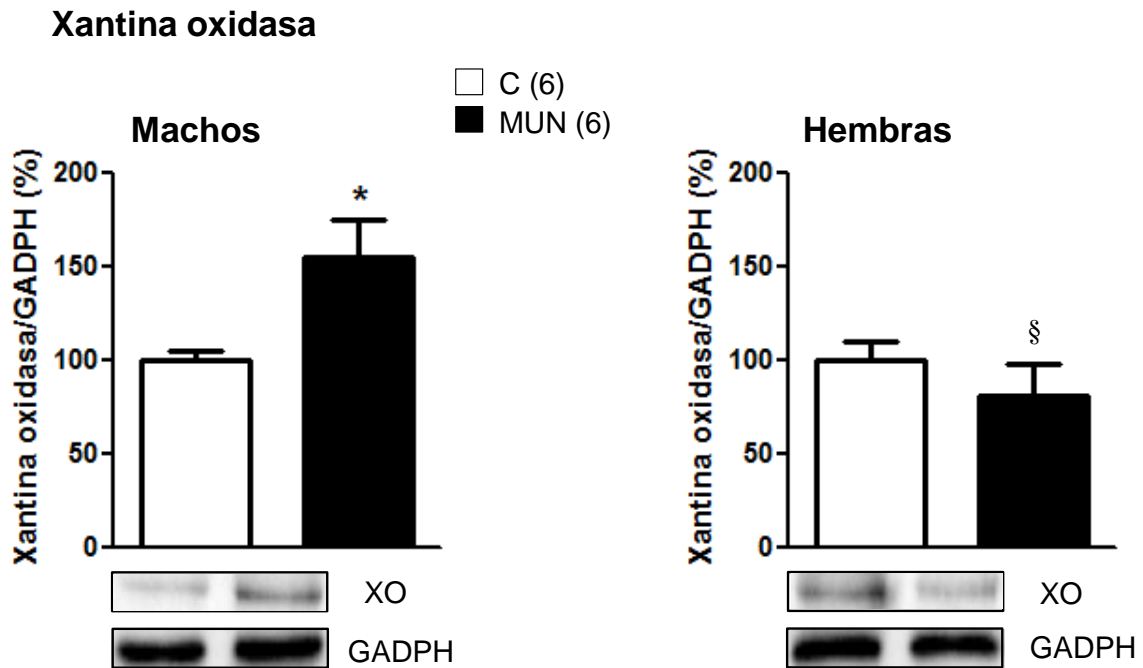
Figura 30. Expresión de las subunidades p22^{phox} y p47^{phox} de la NADPH oxidasa en ratas control y MUN a los 6 meses de edad.



Expresión de la subunidad p22^{phox} (A) y p47^{phox} (B) de la NADPH oxidasa. Los datos se relativizaron frente a la proteína GADPH y se expresaron en porcentaje respecto del control. C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Cada resultado representa la media ± error estándar. Entre paréntesis número de animales; §p<0.05 respecto a machos MUN. Se incluyen blots representativos de cada proteína.

Xantina oxidasa. La expresión de XO fue significativamente mayor en machos MUN respecto al grupo control. Las hembras no presentaron diferencias significativas entre MUN y control. Las hembras MUN presentaron una expresión significativamente menor que los machos MUN (Figura 31).

Figura 31. Expresión de xantina oxidasa en ratas control y MUN a los 6 meses de edad.



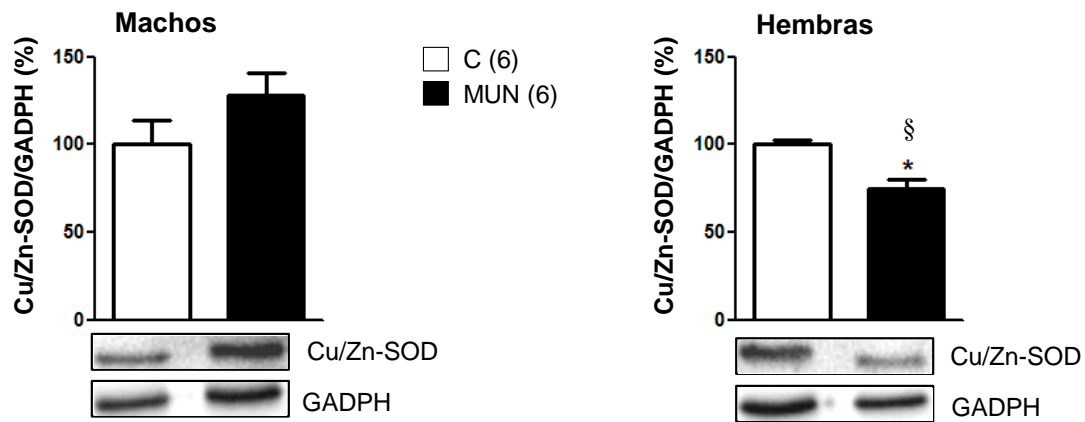
Expresión de Xantina oxidasa (XO). Los datos se relativizaron frente a la proteína GADPH y se expresaron en porcentaje respecto del control. C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Cada resultado representa la media \pm error estándar. Entre paréntesis número de animales; * $p < 0.05$ respecto al grupo control; § $p < 0.05$ respecto a machos MUN. Se incluyen blots representativos de cada proteína.

2.9.2. Enzimas implicadas en la eliminación de radicales libres

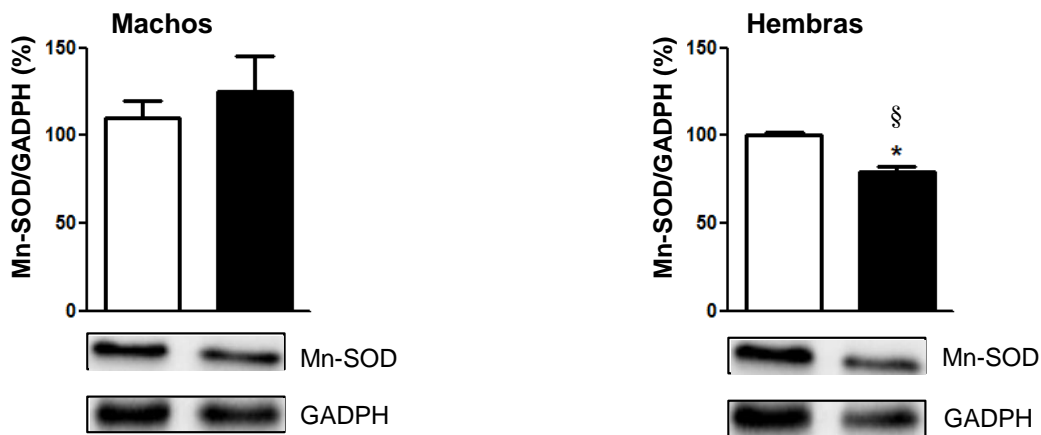
Superóxido dismutasas: A los 6 meses de edad, los machos MUN no presentaron diferencias significativas con respecto a su control en la expresión de Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ni Ec-SOD. Las hembras MUN presentaron una menor expresión de las tres isoformas con respecto a su control (Figura 32). Por otro lado, las hembras MUN presentaron una menor expresión de las tres isoformas con respecto a los machos MUN.

Figura 32. Expresión de las distintas isoformas de SOD en ratas MUN y control a los 6 meses de edad.

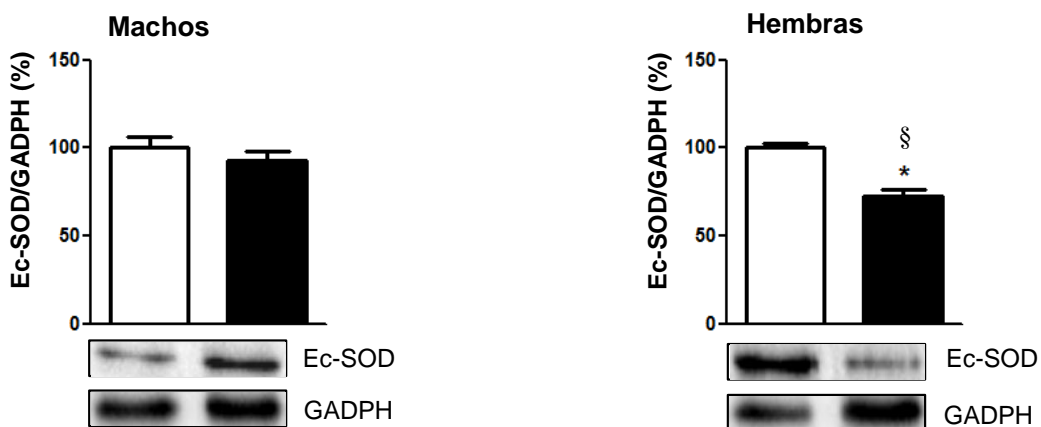
A) Cu/Zn-SOD



B) Mn-SOD



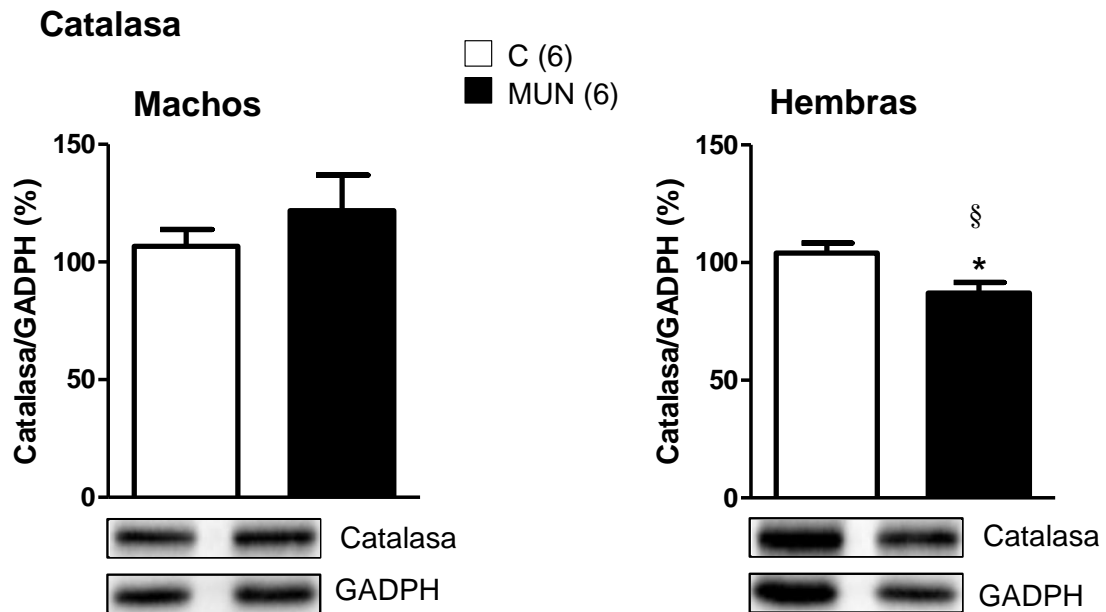
C) Ec-SOD



Expresión de Cu/Zn-SOD (A), Mn-SOD (B) y Ec-SOD (C). Los datos se relativizaron frente a la proteína GADPH y se expresaron en porcentaje respecto del control. C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Cada resultado representa la media \pm error estándar. Entre paréntesis número de animales; * $p < 0.05$ respecto al grupo control; § $p < 0.05$ respecto a machos MUN. Se incluyen blots representativos de cada proteína.

Catalasa. A los 6 meses de edad, los machos MUN no presentaron diferencias significativas en la expresión de catalasa respecto a sus controles. Sin embargo, las hembras MUN presentaron una menor expresión respecto a su control. Las hembras MUN, pero no las control, presentaron una menor expresión de catalasa con respecto a los machos MUN (Figura 33).

Figura 33. Expresión de catalasa en ratas MUN y control a los 6 meses de edad.



Expresión de catalasa. Los datos se relativizaron frente a la proteína GADPH y se expresaron en porcentaje respecto del control. C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Cada resultado representa la media \pm error estándar. Entre paréntesis número de animales; * $p < 0.05$ respecto al grupo control; $^{\S}p < 0.05$ respecto a machos MUN. Se incluyen blots representativos de cada proteína.

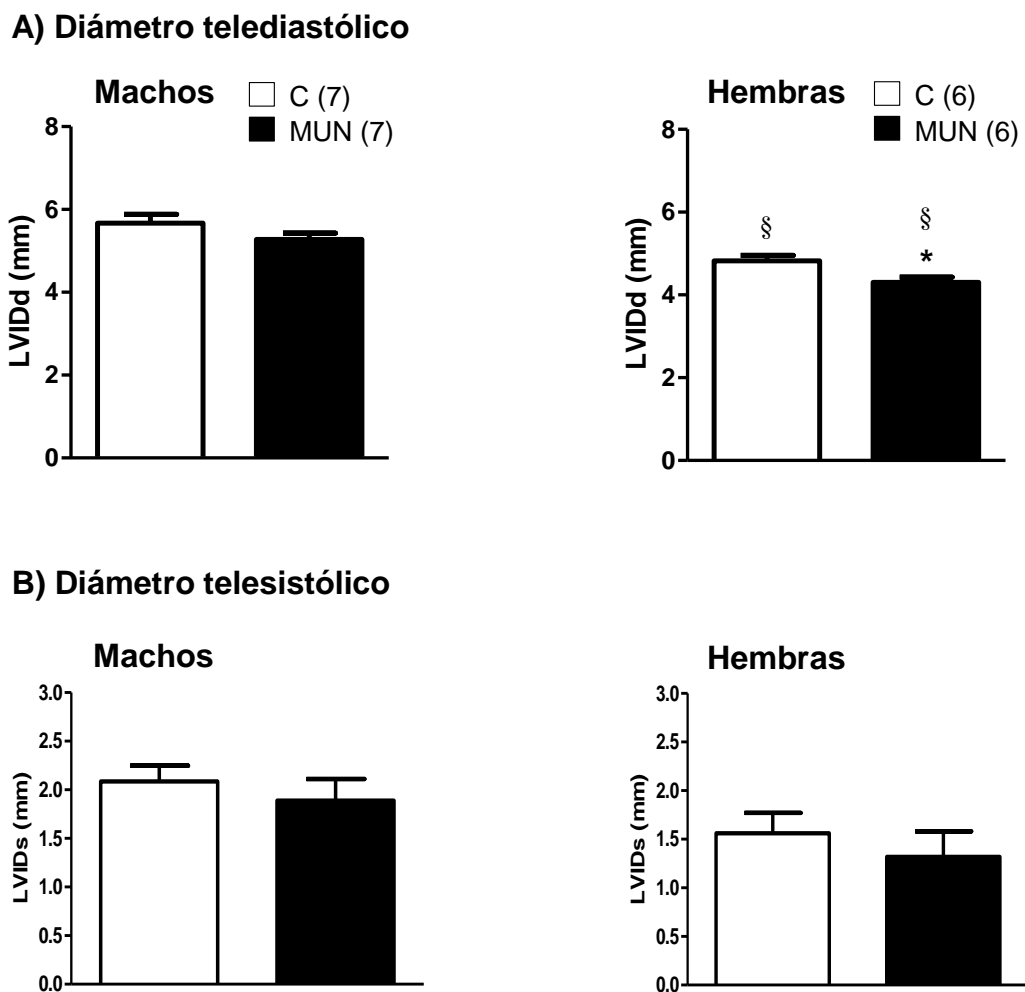
2.10. Ecocardiografía transtorácica a los 6 meses de edad

2.10.1. Diámetros telediastólico y telesistólico

Los machos MUN no presentaron diferencias significativas en el diámetro telediastólico con respecto al control. Las hembras MUN presentaron un diámetro telediastólico significativamente menor que su control. Así mismo, se observó que tanto las hembras control como las MUN tenían un diámetro telediastólico menor que los machos MUN (Figura 34A).

En cuanto al diámetro telesistólico, no se encontraron diferencias significativas entre ratas MUN y control, tanto machos como hembras (Figura 34B)

Figura 34. Diámetro telediastólico y telesistólico del ventrículo izquierdo en ratas MUN y control de 6 meses de edad.



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, *p<0.05 respecto al control del mismo sexo. §p<0.05 comparado con machos de la misma edad (t-test).

2.10.2. Grosor del septo interventricular, grosor de la pared posterior y masa del ventrículo izquierdo

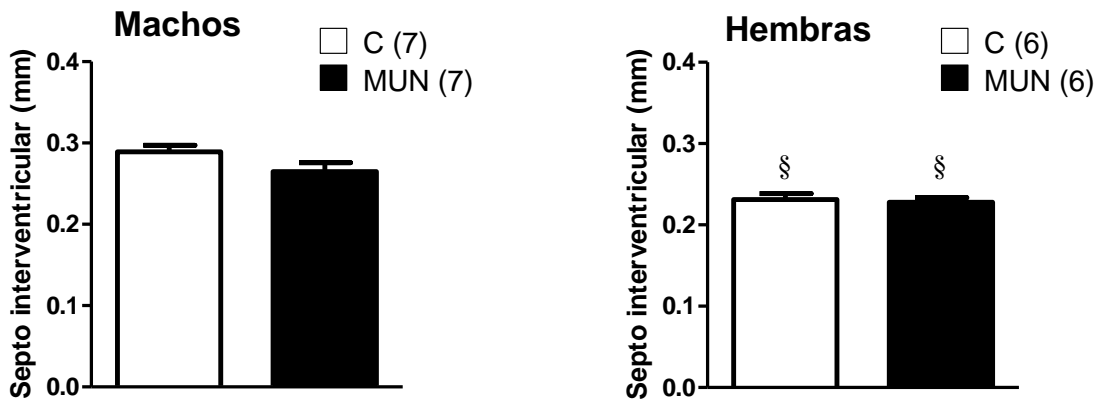
El grosor del septo interventricular no fue significativamente distinto entre ratas MUN y control, tanto en machos como en hembras (figura 35A).

El grosor de la pared posterior fue significativamente menor en los machos MUN con respecto a su control. Por el contrario, en hembras MUN el grosor de la pared posterior fue significativamente mayor que su control. Así mismo, se observó que las hembras control, pero no las MUN, tienen un grosor de la pared posterior significativamente menor que los machos (Figura 35B).

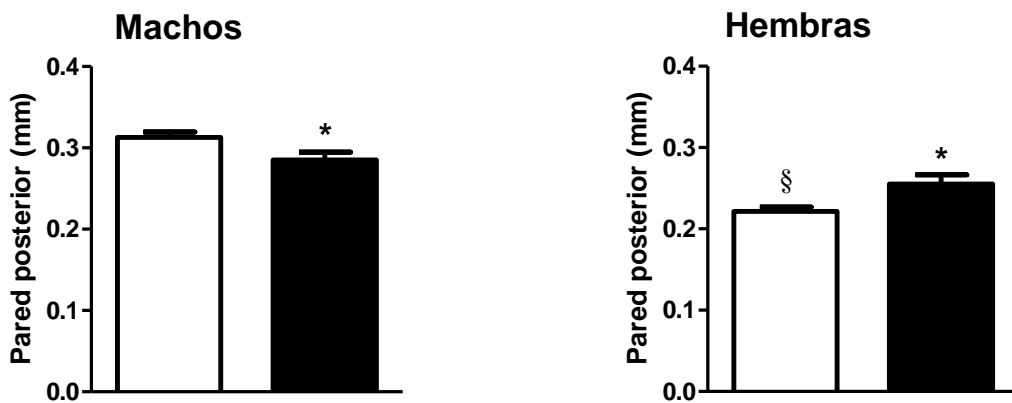
La masa del ventrículo izquierdo fue menor en machos MUN respecto a su control. Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre hembras MUN y control. También se observó que las hembras tanto MUN como control tienen una masa ventricular izquierda significativamente menor que sus respectivos machos (Figura 35C)

Figura 35. Grosor del septo, grosor de la pared posterior y masa del ventrículo izquierdo en ratas MUN y control a los 6 meses de edad.

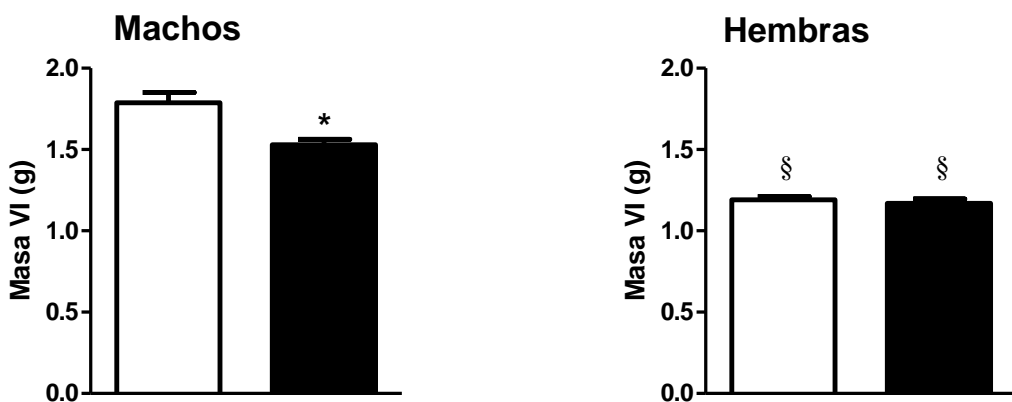
A) Grosor del septo



B) Grosor de la pared posterior



C) Masa ventricular izquierda

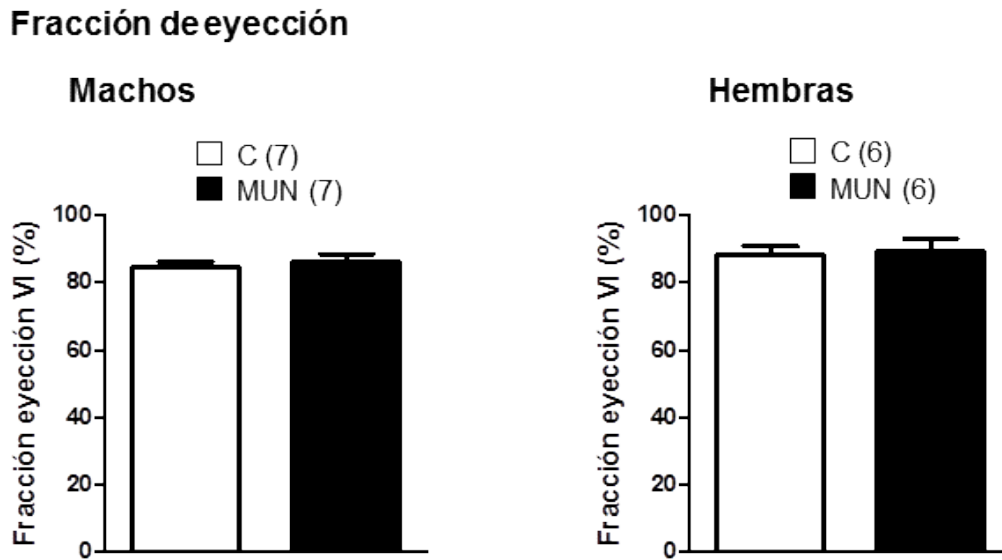


C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales, * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. § $p < 0.05$ comparado con machos de la misma edad (t-test).

2.10.3. Fracción de eyección

No se observaron diferencias en la fracción de eyección del ventrículo izquierdo entre MUN y control, ni en machos ni en hembras (Figura 36).

Figura 36. Fracción de eyección en ratas MUN y control a los 6 meses de edad.



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Entre paréntesis número de animales.

DISCUSIÓN

Estudios epidemiológicos confirman que un bajo peso al nacer, debido a un RIU o prematuridad, predispone a desarrollo de ECV y sus factores de riesgo, como la obesidad y la hipertensión. Los mecanismos responsables de este proceso, conocido como programación fetal, no están completamente establecidos. Uno de los posibles mecanismos implicados es el estrés oxidativo, ya que es un denominador común de la mayoría de enfermedades cardiovasculares. El objetivo de esta Tesis es aportar nuevos conocimientos sobre este tema. En concreto, se evalúa si un estrés fetal se asocia con un desequilibrio en el balance oxidativo previo al desarrollo de hipertensión, analizando la influencia del sexo.

1. Modelo de programación fetal

En el presente estudio, se utiliza un modelo de programación fetal en rata en el que ha sido demostrado que induce bajo peso al nacer y el desarrollo de hipertensión (Vehaskari et al. 2001, Khorram et al. 2007) y obesidad (Desai et al. 2005) en la edad adulta.

Se eligió una reducción global de nutrientes, en lugar de una reducción de la ingesta de proteínas o de micronutrientes (Zambrano et al. 2006), ya que se asemeja más a una subóptima nutrición del feto en humanos, tanto si es por inadecuada nutrición materna o por insuficiencia placentaria.

Por otro lado, se eligió la segunda mitad de la gestación, por ser una intervención menos agresiva ya que, de esta manera, se evitan interferencias en la placentación -que en la rata se produce durante la primera mitad de la gestación- y además, las alteraciones que se encuentren puedan ser atribuidas a la deficiencia de nutrientes al feto.

Nuestros resultados indican que la descendencia de madres desnutridas, tanto machos como hembras, presentan un menor peso corporal al nacimiento. Sin embargo, las crías aceleran la ganancia de peso durante el periodo de lactancia y alcanzan el mismo peso que las ratas control al destete (21 días de edad). De hecho, la diferencia de peso al nacer entre ratas MUN y control es de 36%, en la primera semana de edad es de un 14% en machos y un 11% en hembras, y a los 21 días ya no existen diferencias. De igual manera, el tamaño

corporal, estimado a partir de la longitud de la tibia, alcanza los mismos valores en ratas MUN y control a la edad de 21 días. Este proceso de aceleración del crecimiento, que se conoce como *catch-up growth*, es un mecanismo que compensa la deficiencia en el crecimiento intrauterino. Se ha postulado que el *catch-up growth* juega un papel tan importante como la propia desnutrición fetal en la programación de la ECV. La importancia del periodo postnatal en el desarrollo de ECV se ha demostrado en humanos (Singhal et al. 2004, Kerkhof et al. 2012, Corpeleijn et al. 2013b). También ha sido corroborado en estudios en animales de experimentación en los que se ha observado que si la restricción nutricional en útero se continúa durante la etapa postnatal, se reducen los efectos deletéreos de la programación fetal. El *catch-up growth* se ha postulado también como un proceso importante en el desarrollo de otros factores de riesgo como la obesidad y la diabetes. A los 21 días de edad constatamos que las ratas MUN, tanto machos como hembras, presentan una glucemia más elevada. Por otro lado, previamente hemos demostrado que a esta edad los animales MUN aunque pesan igual que los control tienen mayor cantidad de grasa corporal (Munoz-Valverde et al. 2015). Estas alteraciones observadas tras el *catch up growth* podrían contribuir al desarrollo de diabetes y obesidad además de hipertensión, todos ellos factores de riesgo de ECV.

El presente estudio incluye el análisis de la programación fetal en dos etapas del ciclo vital, 21 días y 6 meses de edad. Se eligió la edad de 21 días por ser el momento en el que se ha producido el *catch up growth* (Ozaki et al. 2001a, Desai et al. 2005) y, posiblemente, la manifestación de sus efectos deletéreos. Otro motivo por el cual se eligió la edad de 21 días, es el hecho de que a esta edad los animales todavía están en la etapa prepuberal (Balonan, Sheng 2000, Ozaki et al. 2001a, Suzuki et al. 2010, Ojeda et al. 2007a), lo que nos permite analizar posibles diferencias en función del sexo independientes de las hormonas gonadales. De hecho, los datos del presente estudio confirman que a los 21 días de edad las ratas presentan niveles bajos de estradiol y testosterona, y que estos son similares en machos y hembras al igual que se ha observado en otros estudios (Keen-Rhinehart et al. 2009). La edad de 6 meses se eligió porque corresponde a la edad adulta en rata, en la que otros autores han descrito alteraciones en órganos como riñón, vasos sanguíneos y

corazón que pueden ser responsables de la hipertensión asociada a la programación fetal (Nuyt 2008, Poston 2011, Paixao, Alexander 2013).

2. Desarrollo de hipertensión

La hipertensión es uno de los factores que, de forma más consistente, se ha asociado con un bajo peso al nacer, como han demostrado estudios epidemiológicos en poblaciones que sufrieron hambruna durante la etapa fetal (Roseboom et al. 2000, Painter et al. 2005). Modelos animales de programación fetal también demuestran que una desnutrición global de la madre gestante (Ozaki et al. 2001a), una reducción de la ingesta de proteínas (Langley-Evans et al. 1999) o una reducción del flujo sanguíneo placentario (Vehaskari, Woods 2005) predisponen a la descendencia para el desarrollo de hipertensión en la edad adulta. Las variaciones de presión sanguínea asociados con la programación fetal han sido poco estudiadas en etapas tempranas del desarrollo, por lo que uno de los objetivos de esta Tesis fue estudiar si a una edad temprana, al destete, ya se ha producido una elevación de la presión arterial.

Por otro lado, la mayor parte de los estudios demuestran que la hipertensión solo se manifiesta en los machos o en etapas más tardías en las hembras. Esta protección de las hembras frente a la programación fetal se ha sugerido que está relacionada con los estrógenos (Ojeda et al. 2007a, Grigore et al. 2008a). Por ello, otro de los objetivos de esta Tesis Doctoral ha sido determinar, en la edad prepúber, si factores distintos a las hormonas sexuales pueden contribuir a las diferencias entre machos y hembras en el desarrollo de la hipertensión y de sus alteraciones asociadas. El presente estudio evidencia que la presión arterial no se encuentra elevada en ratas MUN al destete en ninguno de los sexos y que la hipertensión se desarrolla más tarde sólo en machos. Estos resultados coinciden con los encontrados en otros modelos animales de programación fetal en los que se reduce la ingesta proteica y el flujo placentario (Cambonie et al. 2007, Woods et al. 2001, Vehaskari et al. 2001), lo cual sugiere que la programación fetal de la hipertensión es independiente del tipo de estrés fetal. Una intervención nutricional más agresiva que la utilizada en el presente estudio, en la que se reduce al 70 % la ingesta de nutrientes durante

la gestación, demuestra que las hembras también desarrollan hipertensión pero a más largo plazo que los machos (Ozaki et al. 2001a). Estos datos sugieren que aunque las hembras tienen cierto grado de protección frente al estrés fetal, no están totalmente exentas de alteraciones cardiovasculares asociadas.

3. Alteraciones en el estatus oxidativo global

El estrés oxidativo ha sido propuesto como un posible mecanismo responsable de la programación fetal de la hipertensión (Nuyt 2008, Thompson, Al-Hasan 2012). Este postulado parte de dos hechos. Uno de ellos es la asociación entre hipertensión arterial y estrés oxidativo. Así, en pacientes con HTA y en distintos modelos animales de hipertensión, alteraciones estructurales como el remodelado cardiaco y vascular y la fibrosis asociada están relacionados con un desbalance oxidativo. Así mismo, un exceso de ROS degrada factores vasodilatadores como el NO causando disfunción endotelial, también relacionada con la hipertensión (Touyz, Briones 2011, Condezo-Hoyos et al. 2012, Gonzalez et al. 2008). Estas mismas alteraciones cardiovasculares se han encontrado en modelos de programación fetal de la hipertensión (Cambonie et al. 2007, Nuyt 2008, Poston 2011, Ingelfinger, Nuyt 2012). Por esta razón postulamos que el estrés oxidativo puede estar en el origen de las alteraciones asociadas a la programación fetal. De hecho se ha encontrado en animales sometidos a estrés fetal, la presencia de daño oxidativo en órganos relacionados con la regulación de la presión arterial (Nuyt 2008, Thompson, Al-Hasan 2012, Paixao, Alexander 2013, Tarry-Adkins et al. 2013). Sin embargo, la mayor parte de estos estudios se han realizado en animales en la edad adulta que ya presentan alteraciones cardiovasculares, lo que hace complicado establecer si el daño oxidativo es causado por el estrés fetal o es consecuencia de la patología (Halliwell 2011). Además, existe evidencia de que neonatos con bajo peso, bien por RIU o por prematuridad, tienen deficiencia de antioxidantes (Georgeson et al. 2002) y evidencia de daño oxidativo en el plasma a una edad prepuberal (Mohn et al. 2007). Esto hace pensar que un estrés fetal podría producir alteraciones en el balance oxidativo en edades tempranas, que progresivamente generen daño a estructuras del sistema cardiovascular, y como consecuencia se produzca la elevación de la presión arterial. En el

presente estudio, con objeto de determinar si la capacidad antioxidante global se encontraba afectada por la desnutrición fetal, se evaluaron los antioxidantes endógenos más importantes que pueden hallarse en el plasma.

Nuestros datos indican que al destete, los machos MUN presentan niveles bajos de antioxidantes en plasma (tioles, GSH, SOD y melatonina), mientras que las hembras MUN presentan valores similares a las hembras control. La detoxificación del radical anión superóxido se realiza mediante las diversas isoformas de la SOD (Cu/Zn, Mn y extracelular), las cuales generan H_2O_2 . Los resultados de este estudio muestran una menor actividad de SOD en machos MUN, al igual que han encontrado otros autores utilizando otros modelos de programación fetal en distintas especies (He et al. 2012). En el presente estudio la actividad SOD no se midió directamente, sino indirectamente a través del ensayo SOSA. Este ensayo determina todos los antioxidantes capaces de eliminar el anión superóxido, incluyendo los de bajo peso molecular y las SODs. Nuestros resultados sugieren que la diferencia entre machos MUN y control se debe a las SODs y no a los antioxidantes de bajo peso molecular, ya que no se encontraron diferencias en el ensayo de TAC -que mide antioxidantes no enzimáticos de bajo peso molecular-.

El H_2O_2 no es un radical libre y es un oxidante débil pero, en presencia de Fe^{++} y otros iones metálicos, genera mediante la reacción de Fenton el radical hidroxilo, uno de los ROS más dañinos. Los sistemas biológicos cuentan con dos sistemas de eliminación del exceso de H_2O_2 , que son la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPX) ligada al sistema del GSH. En el presente estudio no se encontraron diferencias en la actividad catalasa entre los grupos experimentales, pero si un menor GSH plasmático en los machos MUN a los 21 días de edad. Otros autores también han evidenciado niveles bajos de GSH a una edad temprana, en varios modelos de programación fetal (Cambonie et al. 2007, Fetoui et al. 2009, He et al. 2012). El GSH se utiliza en la reacción de reciclaje de la GPX durante su actividad detoxificadora del H_2O_2 . Los datos del presente estudio sugieren que la detoxificación del H_2O_2 por la GPX, podría estar disminuida en ratas MUN macho y consecuentemente, podría aumentar la producción de radicales hidroxilo.

La melatonina es una hormona circadiana sintetizada por la glándula pineal, que tiene importantes propiedades antioxidantes tanto directa como indirectamente (Chen et al. 2013). Además de actuar como antioxidante directo a través de la vía Nrf2 (Ding et al. 2014), la melatonina puede estimular la expresión de enzimas antioxidantes como SOD, catalasa, GPx, (Reiter et al. 2000, Okatani et al. 2002, Rodriguez et al. 2004). Además, hay evidencia de que la melatonina podría ser una hormona clave en la vida fetal, que podría mejorar el flujo útero placentario y reducir el estrés oxidativo de la placenta en embarazos con RIU (Maggioni et al. 1999). Así, se ha demostrado una mejora del flujo placentario tras la administración de melatonina en modelos de desnutrición materna durante la gestación (Nagai et al. 2008, Richter et al. 2009).

La secreción de melatonina tiene un ciclo circadiano, alcanzando su concentración máxima en plasma hacia las 2.00 a.m. (Escames, Acuna-Castroviejo 2009). Para evitar tener que realizar las extracciones de sangre durante la noche, se cambió el ciclo de luz-oscuridad durante 15 días tras el destete. Esta intervención se ha demostrado que produce el pico de la hormona alrededor de las 10.30 a.m. (Aguilera et al. 2016). En el presente estudio se encontró que los niveles de melatonina en MUN machos son más bajos que en sus respectivos controles, pero en las hembras no hay diferencias entre MUN y control. Sugerimos que la menor concentración de esta hormona en ratas MUN macho podría estar relacionada con menores niveles de SOD, lo que contribuiría a desequilibrar el estado redox a una edad temprana creando un ambiente pro-oxidante general en los machos MUN. En seres humanos también hay evidencia de que RIU y la prematuridad reducen varios sistemas de defensa antioxidantes como SOD, catalasa y GSH, entre otros (Georgeson et al. 2002), habiéndose propuesto el uso de la melatonina como adyuvante en el tratamiento de enfermedades relacionadas con estrés oxidativo en los recién nacidos (Gitto et al. 2013).

Las especies reactivas son elementos inestables que no pueden medirse en plasma, por lo tanto, no podemos descartar que junto con una reducción de los sistemas antioxidantes, la desnutrición fetal pueda estimular a una edad temprana las enzimas responsables de la síntesis de especies reactivas, dando

lugar a un exceso de ROS. Independientemente de que exista o no un exceso en la producción de ROS en las ratas MUN, nuestros datos indican que hay un desequilibrio en el balance oxidativo. Este desequilibrio se pone de manifiesto por los niveles elevados de los grupos carbonilos -biomarcadores de la oxidación de proteínas- a los 21 días de edad, en machos MUN pero no en hembras. La presencia de daño oxidativo tisular a una edad temprana ha sido puesta de manifiesto en diferentes modelos experimentales de estrés fetal. Por ejemplo, en un modelo de restricción proteica durante la gestación, se encontró un mayor contenido plasmático de TBARS, parámetro que mide el daño por peroxidación lipídica (Fetoui et al. 2009). En el mismo modelo, también ha sido observado daño oxidativo renal en la etapa postnatal, pero no en la etapa fetal (Cambonie et al. 2007).

Estos datos sugieren que durante el desarrollo postnatal, la reducción en los sistemas de defensa antioxidante, produce un desequilibrio que da lugar a daño oxidativo en los tejidos inmaduros. La etapa postnatal es un periodo de desarrollo importante, en la que, en la rata aún no se ha completado la organogénesis. En roedores, varios tejidos como el corazón aún experimentan hiperplasia durante la primera semana de vida postnatal y posteriormente los tejidos continúan creciendo mediante fenómenos de hipertrofia (Zicha, Kunes 1999). Es por esto por lo que durante el periodo postnatal hasta el destete, un daño oxidativo puede producir cambios orgánicos que contribuyan al deterioro de órganos claves para el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular.

Mientras que los machos MUN muestran a una edad temprana una reducción en todos los antioxidantes medidos en plasma, las hembras MUN sólo muestran disminución en los niveles de SOD. Además, las hembras no mostraron signos de oxidación de proteínas a edad temprana, lo que sugiere que tienen una mejor adaptación a los efectos deletéreos de la desnutrición materna, al menos en la etapa pre-puberal. Este mejor balance redox en las hembras podría contribuir, junto con los estrógenos, a su protección frente al desarrollo de HTA.

En relación con la evolución del estado oxidativo con la edad nuestros datos indican que las ratas adultas tienen niveles plasmáticos de antioxidantes menores que al destete, junto con unos niveles más elevados de carbonilos.

Estas diferencias se encontraron no sólo en las ratas MUN sino también en las control, por lo que no parece ser consecuencia de la desnutrición fetal y posiblemente se deba al proceso de envejecimiento.

Aunque el aumento con la edad del daño oxidativo se constató tanto en ratas MUN como en control, tanto en machos como en hembras, los niveles de carbonilos plasmáticos fueron mayores en machos MUN en comparación con los otros grupos. El mayor daño oxidativo observado en machos MUN puede ser debido a la deficiencia de antioxidantes desde etapas tempranas o a que a lo largo del tiempo se estimulen los sistemas productores de ROS. Esta hipótesis está avalada por el hecho de que el daño oxidativo plasmático en los machos MUN se incrementó marcadamente en la edad adulta a pesar de la normalización en todos los antioxidantes evaluados, sobre todo la SOD, que alcanzó niveles superiores a los encontrados en los machos control.

La mayoría de los estudios sobre estrés oxidativo y programación fetal en hipertensión, evalúan parámetros individuales de antioxidantes o de daño oxidativo. El presente trabajo incluye la determinación del parámetro Oxy-score, que permite realizar una valoración global del balance oxidativo plasmático (Veglia et al. 2010, Condezo-Hoyos et al. 2012, Ruiz-Hurtado et al. 2014). Este parámetro tiene en cuenta el conjunto de antioxidantes y el valor de los grupos carbonilos plasmáticos, como medida del daño oxidativo. Así, un valor positivo de Oxy-score significa un predominio de los sistemas de defensa antioxidante, mientras que un valor negativo indica prevalencia del daño oxidativo frente a los sistemas antioxidantes. Los resultados del presente trabajo indican que, a la edad de 21 días, machos y hembras, tanto control como MUN presentan valores positivos de Oxy-score, siendo éste significativamente menor en machos MUN. Sin embargo, en ratas adultas, los valores de Oxy-score son negativos en todos los grupos experimentales, sin diferencias significativas entre ellos. Todo ello indica que los machos MUN tienen una deficiencia global de antioxidantes plasmáticos en la edad temprana. Este déficit plasmático probablemente refleja una reducción de antioxidantes en varios sistemas, como las células endoteliales, células sanguíneas circulantes que están en contacto directo con el plasma. Por otro lado, los niveles de biomarcadores plasmáticos se ha demostrado que se

relacionan con su producción por tejidos como el corazón (Veskoukis et al. 2009).

Los datos del presente estudio sugieren una asociación entre una pobre capacidad antioxidante global en edades tempranas y el desarrollo de hipertensión en la edad adulta en los macho MUN. Puesto que la alteración del balance oxidativo es previa a la elevación de la presión arterial y no se produce en hembras, sugerimos que puede existir una causa efecto; es decir, un estrés oxidativo temprano produciría un daño en órganos relacionados con el control cardiovascular que sería responsable del aumento de presión en la edad adulta. Varias evidencias apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, se ha constatado que un estrés fetal provoca una disminución del número de nefronas a edades tempranas (Zeman 1968, Merlet-Bénichou et al. 1994, Hall, Zeman 1968), disfunción endotelial (Nuyt 2008, Poston 2011), más contenido en matriz extracelular y fibrosis (Langley-Evans 2001), alteraciones que están relacionadas con el estrés oxidativo (Touyz, Briones 2011). Además, existe evidencia directa de que en arterias de animales sometidos a desnutrición fetal, la disfunción endotelial está relacionada con una disminución de la biodisponibilidad de NO por exceso de anión superóxido (Franco et al. 2007). Por último, la relación entre el estrés oxidativo temprano y el desarrollo de hipertensión está apoyada por los estudios de Cambonie y colaboradores, en un modelo de programación fetal, que demuestran que la administración de un antioxidante durante la gestación previene las alteraciones estructurales y funcionales vasculares y el desarrollo de hipertensión en la descendencia (Cambonie et al. 2007).

Todo lo expuesto anteriormente, sugiere que, en el contexto de la programación fetal, el estrés oxidativo temprano podría contribuir al desarrollo de hipertensión, es decir, sería la causa y no la consecuencia. Sin embargo, también es posible que a lo largo de la vida la propia hipertensión continúe dañando los órganos cardiovasculares y estimule la síntesis de ROS, aumentando el estrés oxidativo. Esta conclusión también estaría avalada por el hecho de que las hembras MUN, que no muestran daño oxidativo temprano ni en la edad adulta, tampoco desarrollan hipertensión. Existen estudios que ponen de manifiesto la protección de las hembras frente a las condiciones

desfavorables de la programación fetal, habiéndose sugerido que se debe a las hormonas sexuales. A favor de esta hipótesis está el hecho de que ratas macho de bajo peso al nacer presentan niveles elevados de testosterona en la edad adulta y que la castración de estos animales abole el desarrollo de hipertensión (Ojeda et al. 2007a). En el presente estudio no se midieron los niveles de estrógenos ni testosterona en animales adultos, al no ser un objetivo principal en la Tesis, por lo que no podemos descartar que, junto con un desequilibrio oxidativo, un desequilibrio en las hormonas sexuales también juegue un papel en el desarrollo de hipertensión.

4. Alteraciones cardiacas

En humanos un bajo peso al nacer, debido a una inadecuada nutrición materna, alteraciones de la placenta u otras causas, se asocia con el desarrollo de ECV y, en particular, con patologías cardiacas (Barker, Osmond 1986, Stein et al. 1996). Por otro lado, estudios en modelos de programación fetal han evidenciado que un estrés fetal produce hipertrofia ventricular izquierda (HVI) (Gezmish et al. 2010, Gray et al. 2014), aumento de la susceptibilidad al daño producido por isquemia-reperfusión (Xu et al. 2006, Elmes et al. 2007), así como arritmias (Hu et al. 2000). Uno de los posibles vínculos entre el bajo peso al nacer y el desarrollo posterior de las alteraciones del corazón es la hipertensión, que es un factor de riesgo para la HVI y la isquemia miocárdica, y que también se desarrolla en respuesta a un estrés fetal. Sin embargo, en modelos animales de programación fetal existe evidencia de alteraciones cardíacas precoces, incluso en fetos (Gezmish et al. 2010, Tappia et al. 2013), lo que sugiere que éstas podrían tener lugar independientemente de la hipertensión. Demostrar si las alteraciones del corazón se producen a una edad temprana antes del desarrollo de hipertensión, o si son consecuencia de la misma es uno de los objetivos del presente trabajo.

Por otro lado, al haberse demostrado en animales de experimentación que las hembras están protegidas frente al desarrollo de hipertensión, la mayoría de los estudios experimentales se han centrado en analizar las alteraciones cardiacas únicamente en machos. Sin embargo, los estudios epidemiológicos demuestran que la programación fetal de la enfermedad coronaria se observa también en

mujeres (Osmond et al. 1993, Rich-Edwards et al. 1997) lo que indicaría que, a pesar de su posible protección, a largo plazo pueden también desarrollar alteraciones cardíacas. Por ello, se plantea como objetivo de este trabajo evaluar si el corazón de las hembras está protegido frente a los efectos deletéreos de un estrés fetal, comparando las alteraciones en la etapa prepuberal y adulta. En concreto se valora la influencia de la desnutrición materna en el desarrollo de hipertrofia cardíaca y la posible implicación del estrés oxidativo.

Este estudio demuestra que en machos MUN la hipertrofia cardíaca se desarrolla a lo largo del periodo de lactancia, no siendo evidente todavía a los 7 días de edad pero sí a los 21 días. Esta HVI estimada mediante peso relativo del corazón, fue posteriormente confirmada mediante estudios histológicos. Estos resultados concuerdan con la HVI demostrada al destete en ratas macho sometidas a deficiencia de macro y micro nutrientes durante la vida fetal (Tappia et al. 2013, Tarry-Adkins et al. 2013, Gray et al. 2014, Gezmish et al. 2010). Aunque no hemos evaluado el peso del corazón en etapas previas del desarrollo, otros estudios demuestran que una falta de nutrientes durante la vida intrauterina, produce una reducción en el peso del corazón al nacimiento en ratas (Tarry-Adkins et al. 2013), así como una reducción en el número de cardiomiocitos en el feto (Corstius et al. 2005, Stacy et al. 2009, Zohdi et al. 2014). La vida intrauterina es un periodo crítico del desarrollo que se caracteriza por una alta proliferación y diferenciación celular. En la rata, en concreto, durante la vida fetal se produce hiperplasia celular en el corazón (Zicha, Kunes 1999). Uno de los efectos de la desnutrición y otros factores de estrés fetal, es una reducción en el número de células o un desequilibrio entre los distintos tipos celulares, lo cual a largo plazo, podría estar relacionado con alteraciones orgánicas (Zohdi et al. 2014). Un segundo periodo crítico del desarrollo es la vida postnatal temprana. Durante este periodo los cardiomiocitos continúan proliferando en ratas, durante unas dos semanas, y el crecimiento posterior se lleva a cabo mediante hipertrofia celular (Barker, Clark 1997). Los resultados del presente trabajo que demuestran hipertrofia al destete, junto con los estudios de Tarry-Adkins en los que se observa una

hipotrofia al nacimiento y posterior hipertrofia a los 21 días, sugieren la importancia del *catch up growth* en el desarrollo de la HVI.

Observamos hipertrofia cardiaca en descendientes MUN machos, pero no en hembras, lo que sugiere que las hembras podrían adaptarse mejor al estrés fetal y a las alteraciones tempranas en el crecimiento de los órganos, bajo condiciones de restricción de nutrientes moderadas. Esta conclusión se apoya en datos obtenidos en un modelo de programación fetal en cerdos, con una desnutrición similar a la utilizada en este estudio, que demostró en fetos que el crecimiento de los órganos en condiciones sub-óptimas de nutrición está menos afectado en hembras que en machos (Gonzalez-Bulnes et al. 2015). Sin embargo, en modelos experimentales en los cuales se restringe la proteína, no sólo durante el periodo fetal, sino también a lo largo de la lactancia, se ha encontrado que tanto machos como hembras presentan HVI al destete (Lim et al. 2010). Estos datos sugieren que las hembras pueden contrarrestar mejor que los machos los efectos del estrés fetal, pero si éste es muy agresivo –como puede ser la restricción proteica- o si se prolonga en el tiempo, podría hacer que en las hembras también se produzcan algunas alteraciones cardiacas.

La hipertensión se considera un estímulo para la aparición de hipertrofia ventricular izquierda. Sin embargo, en el modelo experimental utilizado en este trabajo, la hipertensión no parece ser la causa de HVI observada al destete ya que a esta edad la presión arterial es similar en machos MUN y control. Esto sugiere que las alteraciones del corazón y la hipertensión son eventos independientes causados por el estrés fetal. Esta hipótesis se ve apoyada por estudios en otro modelo experimental de programación fetal en rata, que muestran disfunción miocárdica precoz en macho independiente de la hipertensión (Menendez-Castro et al. 2014).

El estudio ecocardiográfico realizado en este trabajo, indica que en ratas MUN macho adultas que ya tienen hipertensión, presentan una menor masa ventricular izquierda. Estos datos coinciden con los obtenidos en un modelo de restricción proteica durante la vida fetal, aunque en este estudio no se analizó la evolución a lo largo del tiempo (Hu et al. 2000). Los datos del presente estudio sugieren que aunque la HTA no es la causa que origina la hipertrofia cardiaca a edad temprana, la elevación de la presión arterial mantenida a lo

largo del tiempo, juega un papel relevante sobre la estructura cardíaca. Esta reducción de la masa ventricular en las ratas MUN macho, a los 6 meses de edad, no se traduce en una alteración funcional, como demuestra el hecho de que no exista modificación en la fracción de eyección. Sin embargo, es posible que estos animales a más largo plazo presenten un deterioro de la función cardíaca, ya que una HVI seguida de pérdida de masa ventricular izquierda representa una evolución clásica hacia una insuficiencia cardíaca.

Las ratas MUN hembra, a diferencia de los machos, no presentan hipertrofia cardíaca temprana ni tampoco desarrollan hipertensión a los 6 meses. Sin embargo, las hembras MUN presentan en la edad adulta mayor grosor de la pared posterior que las hembras control, sin un aumento significativo de la masa ventricular total. Esto sugiere que aunque a edad temprana, las hembras MUN, tienen una mejor adaptación que los machos, a largo plazo también desarrollan remodelado cardíaco.

En los últimos años se ha visto que el estrés oxidativo juega un importante papel en el remodelado cardíaco. En concreto, se ha encontrado que las NADPH oxidasas y la XO, principales enzimas productoras de O_2 , se encuentran elevadas en pacientes con insuficiencia cardíaca y también se han asociado con la patología de la isquemia reperusión (Sirker et al. 2007). Por esta razón, se evaluó si las diferencias en el desarrollo de HVI entre machos y hembras podrían estar relacionadas con alteración del balance oxidativo en tejido cardíaco. Para ello se estudió si los principales sistemas enzimáticos responsables de la producción y eliminación de ROS estaban alterados en el tejido cardíaco (Sirker et al. 2007). Los machos MUN tienen mayor expresión de NADPH oxidasa al destete, mientras que la XO no está elevada hasta la edad adulta. Una tendencia similar, pero que se manifiesta a edades más tempranas, se ha observado en un modelo de restricción de proteínas en fetos (Tarry-Adkins et al. 2013). La presencia de alteraciones a edades más tempranas en el estudio de Tarry-Adkins -elevación de NADPH oxidasa en fetos y XO a 21 días- podrían estar relacionadas, además de con el tipo de intervención nutricional, con el proceso de crecimiento postnatal acelerado. En ambos casos se produce un *catch-up growth*. La aceleración del crecimiento tiene que ver con la reducción del número de individuos por camada; en

nuestro estudio, las camadas se ajustaron a 12 crías, mientras que en el de Tarry-Adkins se redujo a 4, por lo que la aceleración del crecimiento puede ser mayor en el último estudio. Además, ha sido demostrado que el crecimiento postnatal acelerado *per se*, sin estrés fetal previo, también produce hipertrofia cardíaca (Moreira et al. 2009).

A diferencia de lo observado en machos, a los 21 días de edad, las hembras MUN no presentaron niveles de expresión de enzimas productoras de ROS en tejido cardíaco, incluso presentaron menor expresión de NADPH comparada con el control. Así mismo las hembras no presentaron hipertrofia cardíaca temprana. Podemos sugerir que un menor daño oxidativo cardíaco en las hembras, las protege frente al desarrollo de HVI.

En la edad adulta las hembras MUN presentaron una menor expresión de todos los sistemas antioxidantes asociado con una tendencia a una hipertrofia ventricular. Un incremento de la masa ventricular izquierda ha sido previamente descritos en la edad adulta en hembras expuestas a deficiencia de micronutrientes durante la etapa fetal (Battista et al. 2005). El hecho de que en el estudio de Battista et al., la hipertrofia cardíaca se acompañe de una reducción de la actividad de la aconitasa, enzima sensible a daño oxidativo sugiere que una alteración del equilibrio redox puede participar en el desarrollo de HVI en hembras.

En resumen, la desnutrición fetal induce en los machos HVI a una edad temprana, probablemente relacionada con daño oxidativo por exceso de producción de ROS. Esta hipertrofia junto con la hipertensión arterial desarrollada, puede desencadenar insuficiencia cardíaca a largo plazo. En las hembras, por el contrario, presentan a edad temprana protección frente al desarrollo de HVI que podría estar relacionado con un mejor balance oxidativo que los machos a esa edad. El desarrollo de hipertrofia cardíaca en las hembras a los 6 meses de edad, podría estar asociado con los bajos niveles de expresión de enzimas antioxidantes encontrada en tejido cardíaco en la edad adulta.

CONCLUSIONES

Conclusions

Conclusiones

La desnutrición fetal en la rata, provocada por una restricción global de la ingesta al 50% durante la segunda mitad de la gestación:

1. Origina un bajo peso al nacer y una aceleración del crecimiento postnatal, completándose el *catch up growth* al final del periodo de lactancia, tanto en machos como en hembras, sin afectar al inicio de la pubertad.
2. Está asociada con una elevación temprana de la glucemia, lo que a largo plazo podría contribuir al desarrollo de patología metabólica.
3. Induce el desarrollo de hipertensión sólo en los machos, produciéndose la elevación de la presión arterial en la edad adulta y no en etapas anteriores.
4. No altera el balance oxidativo global temprano en las hembras, lo que puede estar asociado con su protección frente al desarrollo de hipertensión.
5. Produce daño oxidativo temprano en los machos, previo al desarrollo de hipertensión, y que se ve incrementado en la edad adulta, probablemente debido a un aumento en la síntesis de ROS.
6. Produce hipertrofia ventricular izquierda, que en los machos ya es evidente al final del periodo de *catch up growth*, mientras que en las hembras se inicia en la edad adulta. Esta hipertrofia es independiente de los niveles de presión arterial en ambos sexos.
7. Induce diferentes alteraciones, en función del sexo, en la expresión de las enzimas responsables de la producción y destrucción de ROS en el corazón que, en ambos sexos, pueden estar asociadas con el desarrollo de hipertrofia ventricular.
8. Este estudio también permite concluir que, desde el destete hasta la edad adulta, en la rata se produce una disminución generalizada de antioxidantes plasmáticos, independientemente de las condiciones de vida fetal.

Conclusions

Fetal undernutrition in the rat induced by a 50% global maternal nutrient restriction during the second half of gestation:

1. Induces low birth weight and postnatal growth acceleration in both males and females, completing the catch up growth at weaning, but does not affect the onset of puberty.
2. Is associated with an early increase in blood glucose, which, in the long term, could contribute to the development of metabolic diseases.
3. Induces hypertension only in males, present in adult age but not in earlier developmental stages.
4. Does not alter the overall oxidative balance in females at early stages of development, which may be associated with their protection against hypertension development.
5. Produces early oxidative damage in males prior to hypertension development, which is further increased in adult age, probably due to an increase in ROS synthesis.
6. Induces left ventricular hypertrophy, which in males is already evident at the end of catch-up growth period, whereas in females is initiated in adult age. This hypertrophy is independent of blood pressure levels in both sexes.
7. Induces sex-specific alterations in the cardiac expression of enzymatic systems responsible for ROS production and destruction, which may be associated with the development of ventricular hypertrophy.
8. This study also supports the conclusion that, from weaning to adulthood there is a general decrease in plasma antioxidants in rat, regardless of fetal life environment.

BIBLIOGRAFIA

AGUILERA, Y., et al. Intake of Bean Sprouts Influences Melatonin and Antioxidant Capacity Biomarkers Levels in Rats. *Food & Function*, 2016.

AIKENS, J; and DIX, TA. Perohydroxyl Radical (HOO.) Initiated Lipid Peroxidation. the Role of Fatty Acid Hydroperoxides. *The Journal of Biological Chemistry*, Aug 15, 1991, vol. 266, no. 23, pp. 15091-15098. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

ALEXANDER, BT; DASINGER, JH and INTAPAD, S. Fetal Programming and Cardiovascular Pathology. *Comprehensive Physiology*, 2015.

ALLEVA, R., et al. The Roles of Coenzyme Q10 and Vitamin E on the Peroxidation of Human Low Density Lipoprotein Subfractions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Sep 26, 1995, vol. 92, no. 20, pp. 9388-9391. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

ALONSO, VB and MONTERO, AC. La Protección Cardíaca Es La Estrategia Prioritaria De Prevención Cardiovascular En Hipertensión Arterial. *Hipertensión Y Riesgo Vascular*, 2004, vol. 21, no. 4, pp. 187-196.

ARCE, DD and PÉREZ, FC. Ácido Úrico:¿ Antioxidante O Pro-Oxidante? Su Relación Con La Hipertensión Arterial. *Panorama Cuba Y Salud*, 2014, vol. 5, no. 1, pp. 3-13.

ARMITAGE, JA., et al. Developmental Programming of Aortic and Renal Structure in Offspring of Rats Fed Fat-rich Diets in Pregnancy. *The Journal of Physiology*, 2005, vol. 565, no. 1, pp. 171-184.

ATKINSON, J.; EPAND, RF and EPAND, RM. Tocopherols and Tocotrienols in Membranes: A Critical Review. *Free Radical Biology and Medicine*, 2008, vol. 44, no. 5, pp. 739-764.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K and SAMMAN, S. Phenolic Compounds in Plants and Agri-Industrial by-Products: Antioxidant Activity, Occurrence, and Potential Uses. *Food Chemistry*, 2006, vol. 99, no. 1, pp. 191-203.

BALLATORI, N., et al. Glutathione Dysregulation and the Etiology and Progression of Human Diseases. *Biological Chemistry*, 2009, vol. 390, no. 3, pp. 191-214.

BALONAN, LC and SHENG, HP. Perinatal Feedings Adversely Affect Lipogenic Activities but Not Glucose Handling in Adult Rats. *Pediatric Research*, 2000, vol. 48, no. 5, pp. 668-673.

BANEGAS, JR., et al. Mortality Attributable to Cardiovascular Risk Factors in Spain. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2003, vol. 57, pp. S18-S21.

BANEGAS, JRB. Epidemiología De La Hipertensión Arterial En España. Situación Actual Y Perspectivas. *Hipertensión*, 2005, vol. 22, no. 9, pp. 353-362.

BARKER, DJ and CLARK, PM. Fetal Undernutrition and Disease in Later Life. *Reviews of Reproduction*, May, 1997, vol. 2, no. 2, pp. 105-112. ISSN 1359-6004; 1359-6004.

BARKER, DJ and OSMOND, C. Infant Mortality, Childhood Nutrition, and Ischaemic Heart Disease in England and Wales. *The Lancet*, 1986, vol. 327, no. 8489, pp. 1077-1081.

BATTISTA, MC., et al. Intra-uterine Growth Restriction and the Programming of Left Ventricular Remodelling in Female Rats. *The Journal of Physiology*, 2005, vol. 565, no. 1, pp. 197-205.

BAYHAN, G., et al. Potential Atherogenic Roles of Lipids, Lipoprotein (a) and Lipid Peroxidation in Preeclampsia. *Gynecological Endocrinology*, 2005, vol. 21, no. 1, pp. 1.

BEILIN, LJ and PUDDEY, IB. Alcohol and Hypertension: An Update. *Hypertension*, 20060403, Jun, 2006, vol. 47, no. 6, pp. 1035-1038. ISSN 1524-4563; 0194-911X.

BERLETT, BS and STADTMAN, ER. Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, Aug 15, 1997, vol. 272, no. 33, pp. 20313-20316. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

BERTRAM, CE and HANSON, MA. Prenatal Programming of Postnatal Endocrine Responses by Glucocorticoids. *Reproduction (Cambridge, England)*, Oct, 2002, vol. 124, no. 4, pp. 459-467. ISSN 1470-1626; 1470-1626.

BERZOSA, C., et al. Acute Exercise Increases Plasma Total Antioxidant Status and Antioxidant Enzyme Activities in Untrained Men. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 20110309, 2011, vol. 2011, pp. 540458. ISSN 1110-7251; 1110-7243.

BEYER WF and FRIDOVICH, I. Effect of Hydrogen Peroxide on the Iron-Containing Superoxide Dismutase of Escherichia Coli. *Biochemistry*, 1987, vol. 26, no. 5, pp. 1251-1257.

BIRI, A., et al. Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Preeclampsia. *International Journal of Gynecology & Obstetrics*, 2007, vol. 96, no. 3, pp. 196-197.

BJORNSTEDT, M., et al. The Thioredoxin and Glutaredoxin Systems are Efficient Electron Donors to Human Plasma Glutathione Peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, Nov 25, 1994, vol. 269, no. 47, pp. 29382-29384. ISSN 0021-9258; 0021-9258.

BLAIR, SN. Physical Inactivity: The Biggest Public Health Problem of the 21st Century. *British Journal of Sports Medicine*, Jan, 2009, vol. 43, no. 1, pp. 1-2. ISSN 1473-0480; 0306-3674.

BLASK, DE, SAUER, LA and DAUCHY, RT. Melatonin as a Chronobiotic/Anticancer Agent: Cellular, Biochemical, and Molecular Mechanisms of Action and their Implications for Circadian-Based Cancer Therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002, vol. 2, no. 2, pp. 113-132.

BOGDARINA, I., et al. Epigenetic Modification of the Renin-Angiotensin System in the Fetal Programming of Hypertension. *Circulation Research*, 20070125, Mar 2, 2007, vol. 100, no. 4, pp. 520-526. ISSN 1524-4571; 0009-7330.

BONNEFONT-ROUSSELOT, D and COLLIN, F. Melatonin: Action as Antioxidant and Potential Applications in Human Disease and Aging. *Toxicology*, 2010, vol. 278, no. 1, pp. 55-67.

BONOMINI, F., et al. Atherosclerosis and Oxidative Stress, 2008.

BRENNER, BM; GARCIA, DL and ANDERSON, S. Glomeruli and Blood Pressure. Less of One, More the Other?. *American Journal of Hypertension*, Oct, 1988, vol. 1, no. 4 Pt 1, pp. 335-347. ISSN 0895-7061; 0895-7061.

BRIGELIUS-FLOHÉ, R. Tissue-Specific Functions of Individual Glutathione Peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine*, 1999, vol. 27, no. 9, pp. 951-965.

BRIONES, AM and TOUYZ, RM. Oxidative Stress and Hypertension: Current Concepts. *Current Hypertension Reports*, 2010, vol. 12, no. 2, pp. 135-142.

BUND, SJ and LEE, RM. Arterial Structural Changes in Hypertension: A Consideration of Methodology, Terminology and Functional Consequence. *Journal of Vascular Research*, 20031222, Nov-Dec, 2003, vol. 40, no. 6, pp. 547-557. ISSN 1018-1172; 1018-1172.

BURDGE, GC., et al. Epigenetic Regulation of Transcription: A Mechanism for Inducing Variations in Phenotype (Fetal Programming) by Differences in Nutrition during Early Life?. *British Journal of Nutrition*, 2007a, vol. 97, no. 06, pp. 1036-1046.

BURDGE, GC., et al. Dietary Protein Restriction of Pregnant Rats in the F 0 Generation Induces Altered Methylation of Hepatic Gene Promoters in the Adult Male Offspring in the F 1 and F 2 Generations. *British Journal of Nutrition*, 2007b, vol. 97, no. 03, pp. 435-439.

BURT, VL., et al. Prevalence of Hypertension in the US Adult Population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension*, Mar, 1995, vol. 25, no. 3, pp. 305-313. ISSN 0194-911X; 0194-911X.

CADENAS, E and SIES, H. The Lag Phase. *Free Radical Research*, 1998, vol. 28, no. 6, pp. 601-609.

CAMBONIE, G., et al. Antenatal Antioxidant Prevents Adult Hypertension, Vascular Dysfunction, and Microvascular Rarefaction Associated with in Utero Exposure to a Low-Protein Diet. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 20061130, Mar, 2007, vol. 292, no. 3, pp. R1236-45. ISSN 0363-6119; 0363-6119.

CAMPO, JE., et al. Blood Pressure Levels and Psychosocial Stress in Students of Health Sciences. University of Valle, Cali, Colombia, 2003-2004. *Colombia Médica*, 2006, vol. 37, no. 2, pp. 21-25.

CHAITANYA, KV., et al. Role of Oxidative Stress in Human Health: An Overview. *J Pharm Res*, 2010, vol. 3, pp. 1330-1333.

CHEN, YC., et al. Roles of Melatonin in Fetal Programming in Compromised Pregnancies. *International Journal of Molecular Sciences*, 2013, vol. 14, no. 3, pp. 5380-5401.

CHEUNG, YF., et al. Relation of Arterial Stiffness with Gestational Age and Birth Weight. *Archives of Disease in Childhood*, Mar, 2004, vol. 89, no. 3, pp. 217-221. ISSN 1468-2044; 0003-9888.

CHOBANIAN, AV., et al. The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *Jama*, 2003, vol. 289, no. 19, pp. 2560-2571.

CONDEZO-HOYOS, L., et al. Liver Growth Factor Treatment Reverses Vascular and Plasmatic Oxidative Stress in Spontaneously Hypertensive Rats. *Journal of Hypertension*, Jun, 2012, vol. 30, no. 6, pp. 1185-1194. ISSN 1473-5598; 0263-6352.

CORPELEIJN, WE; KOUWENHOVEN, SM and VAN GOUDOEVER, JB. Optimal Growth of Preterm Infants. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 20130211, 2013a, vol. 106, pp. 149-155. ISSN 1662-3975; 0084-2230.

CORPELEIJN, WE; KOUWENHOVEN, SM and VAN GOUDOEVER, JB. Optimal Growth of Preterm Infants. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 20130211, 2013b, vol. 106, pp. 149-155. ISSN 1662-3975; 0084-2230.

CORSTIUS, HB., et al. Effect of Intrauterine Growth Restriction on the Number of Cardiomyocytes in Rat Hearts. *Pediatric Research*, 2005, vol. 57, no. 6, pp. 796-800.

COTTRELL, EC., et al. Foetal and Placental 11 β -HSD2: A Hub for Developmental Programming. *Acta Physiologica*, 2014, vol. 210, no. 2, pp. 288-295.

CRAPO, JD., et al. Copper,Zinc Superoxide Dismutase is Primarily a Cytosolic Protein in Human Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Nov 1, 1992, vol. 89, no. 21, pp. 10405-10409. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

CUZZOCREA, S. and REITER, R.J. Pharmacological Actions of Melatonin in Acute and Chronic Inflammation. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002, vol. 2, no. 2, pp. 153-165.

DE CHAMPLAIN, J., et al. Oxidative Stress in Hypertension. *Clinical and Experimental Hypertension*, 2004, vol. 26, no. 7-8, pp. 593-601.

DELISLE, H. Programming of Chronic Disease by Impaired Fetal Nutrition. *Evidence and Implications for Policy and Intervention Strategies*. Suiza: World Health Organization, 2002.

DESAI, M., et al. Programmed Obesity in Intrauterine Growth-Restricted Newborns: Modulation by Newborn Nutrition. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 20040805, Jan, 2005, vol. 288, no. 1, pp. R91-6. ISSN 0363-6119; 0363-6119.

DEVEREUX, RB. Detection of Left Ventricular Hypertrophy by M-Mode Echocardiography. Anatomic Validation, Standardization, and Comparison to Other Methods. *Hypertension*, Feb, 1987, vol. 9, no. 2 Pt 2, pp. II19-26. ISSN 0194-911X; 0194-911X.

DING, K., et al. Melatonin Stimulates Antioxidant Enzymes and Reduces Oxidative Stress in Experimental Traumatic Brain Injury: The Nrf2–ARE Signaling Pathway as a Potential Mechanism. *Free Radical Biology and Medicine*, 2014, vol. 73, pp. 1-11.

DUGUAY, D., et al. Fibroblast Apoptosis Precedes Cardiomyocyte Mass Reduction during Left Ventricular Remodeling in Hypertensive Rats Treated with Amlodipine. *Journal of Hypertension*, Jun, 2007, vol. 25, no. 6, pp. 1291-1299. ISSN 0263-6352; 0263-6352.

EDWARDS, LJ and MCMILLEN, IC. Maternal Undernutrition Increases Arterial Blood Pressure in the Sheep Fetus during Late Gestation. *The Journal of Physiology*, 2001, vol. 533, no. 2, pp. 561-570.

EDWARDS, LJ and MCMILLEN, IC. Periconceptional Nutrition Programs Development of the Cardiovascular System in the Fetal Sheep. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Sep, 2002, vol. 283, no. 3, pp. R669-79. ISSN 0363-6119; 0363-6119.

EL ASSAR, M.; ANGULO, J and RODRÍGUEZ-MAÑAS, L. Oxidative Stress and Vascular Inflammation in Aging. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, vol. 65, pp. 380-401.

ELMES, MJ; GARDNER, DS and LANGLEY-EVANS, SC. Fetal Exposure to a Maternal Low-Protein Diet is Associated with Altered Left Ventricular Pressure Response to Ischaemia–reperfusion Injury. *British Journal of Nutrition*, 2007, vol. 98, no. 01, pp. 93-100.

ELSTNER, EF. Oxygen Radicals—biochemical Basis for their Efficacy. *Klinische Wochenschrift*, 1991, vol. 69, no. 21-23, pp. 949-956.

ESCAMES, G and ACUNA-CASTROVIEJO, D. Melatonin, Synthetic Analogs, and the Sleep/Wake Rhythm. *Revista De Neurologia*, Mar 1-15, 2009, vol. 48, no. 5, pp. 245-254. ISSN 1576-6578; 0210-0010.

EVERSON-ROSE, SA and LEWIS, TT. Psychosocial Factors and Cardiovascular Diseases. *Annu.Rev.Public Health*, 2005, vol. 26, pp. 469-500.

FETOUI, H.; GAROUI, M and ZEGHAL, N. Protein Restriction in Pregnant-and Lactating Rats-induced Oxidative Stress and Hypohomocysteinaemia in their Offspring. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 2009, vol. 93, no. 2, pp. 263-270.

FOLZ, RJ and CRAPO, JD. Extracellular Superoxide Dismutase (SOD3): Tissue-Specific Expression, Genomic Characterization, and Computer-Assisted Sequence Analysis of the Human EC SOD Gene. *Genomics*, 1994, vol. 22, no. 1, pp. 162-171.

FOREST, S and PRIEST, S. Intrauterine Tobacco Smoke Exposure and Congenital Heart Defects. *The Journal of Perinatal & Neonatal Nursing*, 2016, vol. 30, no. 1, pp. 54-63.

FORSDAHL, A. Are Poor Living Conditions in Childhood and Adolescence an Important Risk Factor for Arteriosclerotic Heart Disease?. *British Journal of Preventive & Social Medicine*, Jun, 1977, vol. 31, no. 2, pp. 91-95. ISSN 0007-1242; 0007-1242.

FOWDEN, AL., et al. The Placenta and Intrauterine Programming. *Journal of Neuroendocrinology*, 2008, vol. 20, no. 4, pp. 439-450.

FRANCO, MC., et al. Long-Term Effects of Intrauterine Malnutrition on Vascular Function in Female Offspring: Implications of Oxidative Stress. *Life Sciences*, 2007, vol. 80, no. 8, pp. 709-715.

FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 1986, vol. 58, no. 6, pp. 61-97.

GABORY, A.; ATTIG, L and JUNIEN, C. Sexual Dimorphism in Environmental Epigenetic Programming. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, vol. 304, no. 1, pp. 8-18.

GEORGESON, GD., et al. Antioxidant Enzyme Activities are Decreased in Preterm Infants and in Neonates Born Via Caesarean Section. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 2002, vol. 103, no. 2, pp. 136-139.

GEZMISH, O., et al. Maternal Vitamin D Deficiency Leads to Cardiac Hypertrophy in Rat Offspring. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, 20091013, Feb, 2010, vol. 17, no. 2, pp. 168-176. ISSN 1933-7205; 1933-7191.

GICQUEL, C.; EL-OSTA, A and LE BOUC, Y. Epigenetic Regulation and Fetal Programming. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2008, vol. 22, no. 1, pp. 1-16.

GITTO, E., et al. Protective Role of Melatonin in Neonatal Diseases. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2013, vol. 2013.

GLUCKMAN, PD., et al. Epigenetic Mechanisms that Underpin Metabolic and Cardiovascular Diseases. *Nature Reviews Endocrinology*, 2009, vol. 5, no. 7, pp. 401-408.

GODFREY, KM. The Role of the Placenta in Fetal Programming—a Review. *Placenta*, 2002, vol. 23, pp. S20-S27.

GONZALEZ, JM., et al. Hypertension Increases Middle Cerebral Artery Resting Tone in Spontaneously Hypertensive Rats: Role of Tonic Vasoactive Factor Availability. *Clinical Science (London, England : 1979)*, May, 2008, vol. 114, no. 10, pp. 651-659. ISSN 1470-8736; 0143-5221.

GONZALEZ-BULNES, A., et al. Fetal Sex Modulates Developmental Response to Maternal Malnutrition. *PloS One*, 2015, vol. 10, no. 11, pp. e0142158.

GOODFELLOW, J., et al. Endothelial Function is Impaired in Fit Young Adults of Low Birth Weight. *Cardiovascular Research*, Dec, 1998, vol. 40, no. 3, pp. 600-606. ISSN 0008-6363; 0008-6363.

GORECKI, M., et al. Recombinant Human Superoxide Dismutases: Production and Potential Therapeutical Uses. *Free Radical Research Communications*, 1991, vol. 12, no. 1, pp. 401-410.

GOYAL, MM and BASAK, A. Human Catalase: Looking for Complete Identity. *Protein & Cell*, 2010, vol. 1, no. 10, pp. 888-897.

GRAY, C., et al. Let-7 miRNA Profiles are Associated with the Reversal of Left Ventricular Hypertrophy and Hypertension in Adult Male Offspring from Mothers Undernourished during Pregnancy After Prewaning Growth Hormone Treatment. *Endocrinology*, 2014, vol. 155, no. 12, pp. 4808-4817.

GRIGORE, D.; OJEDA, N and ALEXANDER, BT. Sex Differences in the Fetal Programming of Hypertension. *Gender Medicine*, 2008a, vol. 5, pp. S121-S132.

GRIGORE, Daniela; OJEDA, Norma B and ALEXANDER, Barbara T. Sex Differences in the Fetal Programming of Hypertension. *Gender Medicine*, 2008b, vol. 5, pp. S121-S132.

GROUSSARD, C., et al. Changes in Blood Lipid Peroxidation Markers and Antioxidants After a Single Sprint Anaerobic Exercise. *European Journal of Applied Physiology*, 2003, vol. 89, no. 1, pp. 14-20.

GUALLAR-CASTILLÓN, P., et al. Magnitud Y Manejo De La Hipercolesterolemia En La Población Adulta De España, 2008-2010: El Estudio ENRICA. *Revista Española De Cardiología*, 2012, vol. 65, no. 6, pp. 551-558.

GUERRERO, JM; CARRILLO-VICO, A and LARDONE, PJ. La Melatonina. *Investigación Y Ciencia*, 2007, vol. 373, pp. 30-38.

GUERRERO, JM and REITER, RJ. Melatonin-Immune System Relationships. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002, vol. 2, no. 2, pp. 167-179.

GUTIÉRREZ-FISAC, JL., et al. Prevalence of General and Abdominal Obesity in the Adult Population of Spain, 2008–2010: The ENRICA Study. *Obesity Reviews*, 2012, vol. 13, no. 4, pp. 388-392.

HAHN, P. Effect of Litter Size on Plasma Cholesterol and Insulin and some Liver and Adipose Tissue Enzymes in Adult Rodents. *The Journal of Nutrition*, Jul, 1984, vol. 114, no. 7, pp. 1231-1234. ISSN 0022-3166; 0022-3166.

HALL, SM and ZEMAN, FJ. Kidney Function of the Progeny of Rats Fed a Low Protein Diet. *Journal of Nutrition*, 1968, vol. 95, pp. 49-54.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidants—quo Vadis?. *Trends in Pharmacological Sciences*, 2011, vol. 32, no. 3, pp. 125-130.

HALLIWELL, B and GUTTERIDGE, JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, USA, 2015.

HANSON, Mark A and GLUCKMAN, Peter D. Developmental Origins of Health and Disease: New Insights. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2008, vol. 102, no. 2, pp. 90-93.

HARRISON, R. Structure and Function of Xanthine Oxidoreductase: Where are we Now?. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, vol. 33, no. 6, pp. 774-797.

HAWKINS, CL; MORGAN, PE and DAVIES, MJ. Quantification of Protein Modification by Oxidants. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, vol. 46, no. 8, pp. 965-988.

HE, ZX., et al. Effects of Maternal Protein Or Energy Restriction during Late Gestation on Antioxidant Status of Plasma and Immune Tissues in Postnatal Goats. *Journal of Animal Science*, 20120905, Dec, 2012, vol. 90, no. 12, pp. 4319-4326. ISSN 1525-3163; 0021-8812.

HEIJMANS, BT., et al. Persistent Epigenetic Differences Associated with Prenatal Exposure to Famine in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, vol. 105, no. 44, pp. 17046-17049.

HERSHKOVITZ, D., et al. Fetal Programming of Adult Kidney Disease: Cellular and Molecular Mechanisms. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 20070214, Mar, 2007, vol. 2, no. 2, pp. 334-342. ISSN 1555-905X; 1555-9041.

HISSIN, PJ and HILF, R. A Fluorometric Method for Determination of Oxidized and Reduced Glutathione in Tissues. *Analytical Biochemistry*, 1976, vol. 74, no. 1, pp. 214-226.

HOLEMANS, Kathleen., et al. Maternal Food Restriction in the Second Half of Pregnancy Affects Vascular Function but Not Blood Pressure of Rat Female Offspring. *British Journal of Nutrition*, 1999, vol. 81, no. 01, pp. 73-80.

HOWIE, GJ; SLOBODA, DM and VICKERS, MH. Maternal Undernutrition during Critical Windows of Development Results in Differential and Sex-Specific Effects on Postnatal Adiposity and Related Metabolic Profiles in Adult Rat Offspring. *British Journal of Nutrition*, 2012, vol. 108, no. 2, pp. 298.

HRACSKO, Z., et al. Evaluation of Oxidative Stress Markers in Neonates with Intra-Uterine Growth Retardation. *Redox Report*, 2008, vol. 13, no. 1, pp. 11-16.

HU, XW., et al. Intra-Uterine Growth Retardation Results in Increased Cardiac Arrhythmias and Raised Diastolic Blood Pressure in Adult Rats. *Cardiovascular Research*, Nov, 2000, vol. 48, no. 2, pp. 233-243. ISSN 0008-6363; 0008-6363.

HULT, M., et al. Hypertension, Diabetes and Overweight: Looming Legacies of the Biafran Famine. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 10, pp. e13582.

HUSAIN, K., et al. Inflammation, Oxidative Stress and Renin Angiotensin System in Atherosclerosis. *World Journal of Biological Chemistry*, 2015, vol. 6, no. 3, pp. 209.

ILLNEROVA, H., et al. Effect of One Minute Exposure to Light at Night on Rat Pineal Serotonin N-acetyltransferase and Melatonin. *Journal of Neurochemistry*, 1979, vol. 32, no. 2, pp. 673-675.

INGELFINGER, JR and NUYT, AM. Impact of Fetal Programming, Birth Weight, and Infant Feeding on Later Hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension*, 2012, vol. 14, no. 6, pp. 365-371.

INTENGAN, HD and SCHIFFRIN, EL. Structure and Mechanical Properties of Resistance Arteries in Hypertension: Role of Adhesion Molecules and Extracellular Matrix Determinants. *Hypertension*, Sep, 2000, vol. 36, no. 3, pp. 312-318. ISSN 1524-4563; 0194-911X.

JAENISCH, R and BIRD, A. Epigenetic Regulation of Gene Expression: How the Genome Integrates Intrinsic and Environmental Signals. *Nature Genetics*, 2003, vol. 33, pp. 245-254.

JAMES, PA., et al. 2014 Evidence-Based Guideline for the Management of High Blood Pressure in Adults: Report from the Panel Members Appointed to the Eighth Joint National Committee (JNC 8). *Jama*, 2014, vol. 311, no. 5, pp. 507-520.

JANOT, M., et al. Bilateral Uterine Vessel Ligation as a Model of Intrauterine Growth Restriction in Mice. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 2014, vol. 12, no. 1, pp. 1-11.

KEEN-RHINEHART, E.; DESAI, M and ROSS, MG. Central Insulin Sensitivity in Male and Female Juvenile Rats. *Hormones and Behavior*, 2009, vol. 56, no. 3, pp. 275-280.

KEHRER, JP. The Haber–Weiss Reaction and Mechanisms of Toxicity. *Toxicology*, 2000, vol. 149, no. 1, pp. 43-50.

KENNAWAY, DJ and WRIGHT, H. Melatonin and Circadian Rhythms. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2002, vol. 2, no. 2, pp. 199-209.

KERKHOF, GF., et al. Health Profile of Young Adults Born Preterm: Negative Effects of Rapid Weight Gain in Early Life. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2012, vol. 97, no. 12, pp. 4498-4506.

KHORRAM, O., et al. Maternal Undernutrition Inhibits Angiogenesis in the Offspring: A Potential Mechanism of Programmed Hypertension. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 20070516, Aug, 2007, vol. 293, no. 2, pp. R745-53. ISSN 0363-6119; 0363-6119.

LAHERA, V., et al. Endothelial Dysfunction in Hypertension. *Nefrología : Publicación Oficial De La Sociedad Espanola Nefrología*, 2003, vol. 23 Suppl 4, pp. 3-12. ISSN 0211-6995; 0211-6995.

LAKSHMY, R. Metabolic Syndrome: Role of Maternal Undernutrition and Fetal Programming. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2013, vol. 14, no. 3, pp. 229-240.

LANGLEY-EVANS, SC. Fetal Programming of Cardiovascular Function through Exposure to Maternal Undernutrition. *Proceedings of the Nutrition Society*, 2001, vol. 60, no. 04, pp. 505-513.

LANGLEY-EVANS, SC. Intrauterine Programming of Hypertension in the Rat: Nutrient Interactions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 1996, vol. 114, no. 4, pp. 327-333.

LANGLEY-EVANS, SC; PHILLIPS, GJ and JACKSON, AA. In Utero Exposure to Maternal Low Protein Diets Induces Hypertension in Weanling Rats, Independently of Maternal Blood Pressure Changes. *Clinical Nutrition*, 1994, vol. 13, no. 5, pp. 319-324.

LANGLEY-EVANS, SC; WELHAM, SJ and JACKSON, AA. Fetal Exposure to a Maternal Low Protein Diet Impairs Nephrogenesis and Promotes Hypertension in the Rat. *Life Sciences*, 1999, vol. 64, no. 11, pp. 965-974.

LASSEGUE, B and CLEMPUS, RE. Vascular NAD(P)H Oxidases: Specific Features, Expression, and Regulation. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, Aug, 2003, vol. 285, no. 2, pp. R277-97. ISSN 0363-6119; 0363-6119.

LEESON, CP., et al. Impact of Low Birth Weight and Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Function in Early Adult Life. *Circulation*, Mar 6, 2001, vol. 103, no. 9, pp. 1264-1268. ISSN 1524-4539; 0009-7322.

LI, H.; HORKE, S and FÖRSTERMANN, U. Vascular Oxidative Stress, Nitric Oxide and Atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2014, vol. 237, no. 1, pp. 208-219.

LI, S., et al. Low Birth Weight is Associated with Chronic Kidney Disease Only in Men. *Kidney International*, 2008, vol. 73, no. 5, pp. 637-642.

LIEBMANN, PM., et al. Melatonin and the Immune System. *International Archives of Allergy and Immunology*, 1997, vol. 112, no. 3, pp. 203-211.

LIM, K.; ZIMANYI, MA and BLACK, MJ. Effect of Maternal Protein Restriction during Pregnancy and Lactation on the Number of Cardiomyocytes in the Postproliferative Weanling Rat Heart. *The Anatomical Record*, 2010, vol. 293, no. 3, pp. 431-437.

LINKE, A., et al. Antioxidative Effects of Exercise Training in Patients with Chronic Heart Failure: Increase in Radical Scavenger Enzyme Activity in Skeletal Muscle. *Circulation*, 20050404, Apr 12, 2005, vol. 111, no. 14, pp. 1763-1770. ISSN 1524-4539; 0009-7322.

LOCH, D., et al. Rosuvastatin Attenuates Heart Failure and Cardiac Remodelling in the Ageing Spontaneously Hypertensive Rat. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2009, vol. 105, no. 4, pp. 262-270.

LOTITO, SB and FREI, B. Consumption of Flavonoid-Rich Foods and Increased Plasma Antioxidant Capacity in Humans: Cause, Consequence, Or Epiphenomenon?. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, vol. 41, no. 12, pp. 1727-1746.

LUO, ZC., et al. Tracing the Origins of “fetal Origins” of Adult Diseases: Programming by Oxidative Stress?. *Medical Hypotheses*, 2006, vol. 66, no. 1, pp. 38-44.

MAGGIONI, C., et al. A Half-Yearly Aspect of Circulating Melatonin in Pregnancies Complicated by Intrauterine Growth Retardation. *Neuroendocrinology Letters*, 1999, vol. 20, pp. 55-68.

- MANACH, C., et al. Bioavailability and Bioefficacy of Polyphenols in Humans. I. Review of 97 Bioavailability Studies. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Jan, 2005, vol. 81, no. 1 Suppl, pp. 230S-242S. ISSN 0002-9165; 0002-9165.
- MANALICH, R., et al. Relationship between Weight at Birth and the Number and Size of Renal Glomeruli in Humans: A Histomorphometric Study. *Kidney International*, 2000, vol. 58, no. 2, pp. 770-773.
- MANSIA, G., et al. 2007 ESH-ESC Guidelines for the Management of Arterial Hypertension-the Task Force for the Management of Arterial Hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Blood Pressure*, 2007, vol. 16, no. 3, pp. 135-232.
- MARCHESI, C., et al. Endothelial Nitric Oxide Synthase Uncoupling and Perivascular Adipose Oxidative Stress and Inflammation Contribute to Vascular Dysfunction in a Rodent Model of Metabolic Syndrome. *Hypertension*, 20091012, Dec, 2009, vol. 54, no. 6, pp. 1384-1392. ISSN 1524-4563; 0194-911X.
- MARGUERON, R and REINBERG, D. Chromatin Structure and the Inheritance of Epigenetic Information. *Nature Reviews Genetics*, 2010, vol. 11, no. 4, pp. 285-296.
- MARTYN, CN and GREENWALD, SE. Impaired Synthesis of Elastin in Walls of Aorta and Large Conduit Arteries during Early Development as an Initiating Event in Pathogenesis of Systemic Hypertension. *The Lancet*, 1997, vol. 350, no. 9082, pp. 953-955.
- MATHIASSEN, ON., et al. Small Artery Structure is an Independent Predictor of Cardiovascular Events in Essential Hypertension. *Journal of Hypertension*, May, 2007, vol. 25, no. 5, pp. 1021-1026. ISSN 0263-6352; 0263-6352.
- MCCANCE, RA. Food, Growth, and Time. *The Lancet*, 1962, vol. 280, no. 7258, pp. 671-676.
- MCENIERY, CM; WILKINSON, IB and AVOLIO, AP. Age, Hypertension and Arterial Function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2007, vol. 34, no. 7, pp. 665-671.
- MENENDEZ-CASTRO, C., et al. Impaired Myocardial Performance in a Normotensive Rat Model of Intrauterine Growth Restriction. *Pediatric Research*, 2014, vol. 75, no. 6, pp. 697-706.
- MERLET-BÉNICHOU, C., et al. Intrauterine Growth Retardation Leads to a Permanent Nephron Deficit in the Rat. *Pediatric Nephrology*, 1994, vol. 8, no. 2, pp. 175-180.
- METGES, CC. Early Nutrition Programming and Health Outcomes in Later Life. Springer, 2009. *Early Nutrition and Later Obesity: Animal Models Provide Insights into Mechanisms*, pp. 105-112.

MILLER, DM; BUETTNER, GR and AUST, SD. Transition Metals as Catalysts of "autoxidation" Reactions. *Free Radical Biology and Medicine*, 1990, vol. 8, no. 1, pp. 95-108.

MILLER, V. M.; RECKELHOFF, JF and SIECK, GC. Physiology's Impact: Stop Ignoring the Obvious-Sex Matters!. *Physiology (Bethesda, Md.)*, Jan, 2014, vol. 29, no. 1, pp. 4-5. ISSN 1548-9221; 1548-9221.

MOHN, A., et al. Increased Oxidative Stress in Prepubertal Children Born Small for Gestational Age. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2007, vol. 92, no. 4, pp. 1372-1378.

MONTEZANO, AC., et al. Angiotensin II and Vascular Injury. *Current Hypertension Reports*, 2014, vol. 16, no. 6, pp. 1-11.

MORALES, C; HITA, A and GELPI, RJ. Fisiología Integrada De La Hipertrofia Cardíaca. *Rev Argent Cardiol*, 1999, vol. 67, pp. 377-388.

MOREIRA, AS., et al. Left Ventricular Hypertrophy Induced by Overnutrition Early in Life. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2009, vol. 19, no. 11, pp. 805-810.

MULVANY, MJ. Structural Abnormalities of the Resistance Vasculature in Hypertension. *Journal of Vascular Research*, 20031223, Nov-Dec, 2003, vol. 40, no. 6, pp. 558-560. ISSN 1018-1172; 1018-1172.

MUNOZ-VALVERDE, D., et al. Effect of Fetal Undernutrition and Postnatal Overfeeding on Rat Adipose Tissue and Organ Growth at Early Stages of Postnatal Development. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, 20141203, 2015, vol. 64, no. 4, pp. 547-559. ISSN 1802-9973; 0862-8408.

NAGAI, R., et al. Melatonin Preserves Fetal Growth in Rats by Protecting Against Ischemia/Reperfusion-induced Oxidative/Nitrosative Mitochondrial Damage in the Placenta. *Journal of Pineal Research*, 2008, vol. 45, no. 3, pp. 271-276.

NUYT, AM. Mechanisms Underlying Developmental Programming of Elevated Blood Pressure and Vascular Dysfunction: Evidence from Human Studies and Experimental Animal Models. *Clinical Science*, 2008, vol. 114, pp. 1-17.

OJEDA, NB; INTAPAD, S and ALEXANDER, BT. Sex Differences in the Developmental Programming of Hypertension. *Acta Physiologica*, 2014, vol. 210, no. 2, pp. 307-316.

OJEDA, NB., et al. Estrogen Protects Against Increased Blood Pressure in Postpubertal Female Growth Restricted Offspring. *Hypertension*, 20070827, Oct, 2007a, vol. 50, no. 4, pp. 679-685. ISSN 1524-4563; 0194-911X.

OJEDA, NB., et al. Testosterone Contributes to Marked Elevations in Mean Arterial Pressure in Adult Male Intrauterine Growth Restricted Offspring. *American Journal of Physiology.Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 20060817, Feb, 2007b, vol. 292, no. 2, pp. R758-63. ISSN 0363-6119; 0363-6119.

OKATANI, Y., et al. Melatonin Reduces Oxidative Damage of Neural Lipids and Proteins in Senescence-Accelerated Mouse. *Neurobiology of Aging*, 2002, vol. 23, no. 4, pp. 639-644.

ORTIZ, LA., et al. Effect of Prenatal Dexamethasone on Rat Renal Development. *Kidney International*, 2001, vol. 59, no. 5, pp. 1663-1669.

OSMOND, C.; and BARKER, DJ. Fetal, Infant, and Childhood Growth are Predictors of Coronary Heart Disease, Diabetes, and Hypertension in Adult Men and Women. *Environmental Health Perspectives*, Jun, 2000, vol. 108 Suppl 3, pp. 545-553. ISSN 0091-6765; 0091-6765.

OSMOND, C., et al. Early Growth and Death from Cardiovascular Disease in Women. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, Dec 11, 1993, vol. 307, no. 6918, pp. 1519-1524. ISSN 0959-8138; 0959-535X.

OZAKI, T., et al. Dietary Restriction in Pregnant Rats Causes Gender-related Hypertension and Vascular Dysfunction in Offspring. *The Journal of Physiology*, 2001a, vol. 530, no. 1, pp. 141-152.

OZAKI, T., et al. Dietary Restriction in Pregnant Rats Causes Gender-Related Hypertension and Vascular Dysfunction in Offspring. *The Journal of Physiology*, Jan 1, 2001b, vol. 530, no. Pt 1, pp. 141-152. ISSN 0022-3751; 0022-3751.

PADAYATTY, SJ and LEVINE, M. New Insights into the Physiology and Pharmacology of Vitamin C. *CMAJ : Canadian Medical Association Journal = Journal De L'Association Medicale Canadienne*, Feb 6, 2001, vol. 164, no. 3, pp. 353-355. ISSN 0820-3946; 0820-3946.

PAINTER, RC; ROSEBOOM, TJ and BLEKER, OP. Prenatal Exposure to the Dutch Famine and Disease in Later Life: An Overview. *Reproductive Toxicology*, 2005, vol. 20, no. 3, pp. 345-352.

PAIXAO, AD and ALEXANDER, BT. How the Kidney is Impacted by the Perinatal Maternal Environment to Develop Hypertension. *Biology of Reproduction*, 20131219, Dec 19, 2013, vol. 89, no. 6, pp. 144. ISSN 1529-7268; 0006-3363.

POSTON, L. Influence of Maternal Nutritional Status on Vascular Function in the Offspring. *Microcirculation*, 2011, vol. 18, no. 4, pp. 256-262.

PUZYREV, VP. Genetic Bases of Human Comorbidity. *Russian Journal of Genetics*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 408-417.

RAVELLI, AC., et al. Obesity at the Age of 50 Y in Men and Women Exposed to Famine Prenatally. *The American Journal of Clinical Nutrition*, Nov, 1999, vol. 70, no. 5, pp. 811-816. ISSN 0002-9165; 0002-9165.

REITER, RJ. Pharmacological Utility of Melatonin in Reducing Oxidative Cellular and Molecular Damage. *Pol.J.Pharmacol*, 2004, vol. 56, pp. 159-170.

REITER, RJ. Antioxidant Actions of Melatonin. *Advances in Pharmacology*, 1997, vol. 38, pp. 103-117.

REITER, RJ and TAN, DX. What Constitutes a Physiological Concentration of Melatonin?. *Journal of Pineal Research*, 2003, vol. 34, no. 1, pp. 79-80.

REITER, RJ., et al. Actions of Melatonin in the Reduction of Oxidative Stress. *Journal of Biomedical Science*, 2000, vol. 7, no. 6, pp. 444-458.

REITER, RJ., et al. The Oxidant/Antioxidant Network: Role of Melatonin. *Biological Signals and Receptors*, Jan-Apr, 1999, vol. 8, no. 1-2, pp. 56-63. ISSN 1422-4933; 1422-4933.

RICH-EDWARDS, JW., et al. Longitudinal Study of Birth Weight and Adult Body Mass Index in Predicting Risk of Coronary Heart Disease and Stroke in Women. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 20050427, May 14, 2005, vol. 330, no. 7500, pp. 1115. ISSN 1756-1833; 0959-535X.

RICH-EDWARDS, JW., et al. Birth Weight and Risk of Cardiovascular Disease in a Cohort of Women Followed Up since 1976. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, Aug 16, 1997, vol. 315, no. 7105, pp. 396-400. ISSN 0959-8138; 0959-535X.

RICHTER, HG., et al. Melatonin Improves Placental Efficiency and Birth Weight and Increases the Placental Expression of Antioxidant Enzymes in Undernourished Pregnancy. *Journal of Pineal Research*, 2009, vol. 46, no. 4, pp. 357-364.

RIZZONI, D., et al. Prognostic Significance of Small-Artery Structure in Hypertension. *Circulation*, 20031013, Nov 4, 2003, vol. 108, no. 18, pp. 2230-2235. ISSN 1524-4539; 0009-7322.

RODRIGUEZ, C., et al. Regulation of Antioxidant Enzymes: A Significant Role for Melatonin. *Journal of Pineal Research*, 2004, vol. 36, no. 1, pp. 1-9.

ROSEBOOM, TJ., et al. Coronary Heart Disease After Prenatal Exposure to the Dutch Famine, 1944-45. *Heart (British Cardiac Society)*, Dec, 2000, vol. 84, no. 6, pp. 595-598. ISSN 1468-201X; 1355-6037.

RUILOPE, LM and SCHMIEDER, RE. Left Ventricular Hypertrophy and Clinical Outcomes in Hypertensive Patients. *American Journal of Hypertension*, 20080313, May, 2008, vol. 21, no. 5, pp. 500-508. ISSN 0895-7061; 0895-7061.

RUIZ-HURTADO, G., et al. Development of Albuminuria and Enhancement of Oxidative Stress during Chronic Renin-Angiotensin System Suppression. *Journal of Hypertension*, 2014, vol. 32, pp. 000-000.

SAHN, DJ., et al. Recommendations regarding Quantitation in M-Mode Echocardiography: Results of a Survey of Echocardiographic Measurements. *Circulation*, Dec, 1978, vol. 58, no. 6, pp. 1072-1083. ISSN 0009-7322; 0009-7322.

SALEH, L and PLIETH, C. A Coelenterazine-Based Luminescence Assay to Quantify High-Molecular-Weight Superoxide Anion Scavenger Activities. *Nature Protocols*, 2010a, vol. 5, no. 10, pp. 1635-1641.

SALEH, L and PLIETH, C. Total Low-Molecular-Weight Antioxidants as a Summary Parameter, Quantified in Biological Samples by a Chemiluminescence Inhibition Assay. *Nature Protocols*, 2010b, vol. 5, no. 10, pp. 1627-1634.

SECKL, JR. Prenatal Glucocorticoids and Long-Term Programming. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies*, Nov, 2004, vol. 151 Suppl 3, pp. U49-62. ISSN 0804-4643; 0804-4643.

SHERMAN, RC and LANGLEY-EVANS, SC. Antihypertensive Treatment in Early Postnatal Life Modulates Prenatal Dietary Influences upon Blood Pressure in the Rat. *Clinical Science (London, England : 1979)*, Mar, 2000, vol. 98, no. 3, pp. 269-275. ISSN 0143-5221; 0143-5221.

SIES, H. Oxidative Stress: Oxidants and Antioxidants. *Experimental Physiology*, 1997, vol. 82, no. 2, pp. 291-295.

SINCLAIR, KD., et al. DNA Methylation, Insulin Resistance, and Blood Pressure in Offspring Determined by Maternal Periconceptional B Vitamin and Methionine Status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20071127, Dec 4, 2007, vol. 104, no. 49, pp. 19351-19356. ISSN 1091-6490; 0027-8424.

SINGHAL, A., et al. Is Slower Early Growth Beneficial for Long-Term Cardiovascular Health?. *Circulation*, 20040301, Mar 9, 2004, vol. 109, no. 9, pp. 1108-1113. ISSN 1524-4539; 0009-7322.

SIRKER, A., et al. Involvement of NADPH Oxidases in Cardiac Remodelling and Heart Failure. *American Journal of Nephrology*, 20070927, 2007, vol. 27, no. 6, pp. 649-660. ISSN 1421-9670; 0250-8095.

SLAMA, M., et al. Validation of Echocardiographic and Doppler Indexes of Left Ventricular Relaxation in Adult Hypertensive and Normotensive Rats. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 20050429, Sep, 2005, vol. 289, no. 3, pp. H1131-6. ISSN 0363-6135; 0363-6135.

STACY, V., et al. The Influence of Naturally Occurring Differences in Birthweight on Ventricular Cardiomyocyte Number in Sheep. *The Anatomical Record*, 2009, vol. 292, no. 1, pp. 29-37.

STEIN, CE., et al. Fetal Growth and Coronary Heart Disease in South India. *The Lancet*, 1996, vol. 348, no. 9037, pp. 1269-1273.

SUZUKI, M.; SHIBANUMA, M and KIMURA, S. Effect of Severe Maternal Dietary Restriction on Growth and Intra-Abdominal Adipose Tissue Weights in Offspring Rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 2010, vol. 56, no. 5, pp. 293-298.

SZASZ, T., et al. A Comparison of Arteries and Veins in Oxidative Stress: Producers, Destroyers, Function, and Disease. *Experimental Biology and Medicine (Maywood, N.J.)*, Jan, 2007, vol. 232, no. 1, pp. 27-37. ISSN 1535-3702; 1535-3699.

TAN, DX., et al. Mechanistic and Comparative Studies of Melatonin and Classic Antioxidants in Terms of their Interactions with the ABTS Cation Radical. *Journal of Pineal Research*, 2003, vol. 34, no. 4, pp. 249-259.

TAPPIA, PS., et al. Adverse Cardiac Remodeling due to Maternal Low Protein Diet is Associated with Alterations in Expression of Genes Regulating Glucose Metabolism. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 2013, vol. 23, no. 2, pp. 130-135.

TARE, M., et al. Uteroplacental Insufficiency and Lactational Environment Separately Influence Arterial Stiffness and Vascular Function in Adult Male Rats. *Hypertension*, 20120625, Aug, 2012, vol. 60, no. 2, pp. 378-386. ISSN 1524-4563; 0194-911X.

TARRADE, A., et al. Placental Contribution to Nutritional Programming of Health and Diseases: Epigenetics and Sexual Dimorphism. *The Journal of Experimental Biology*, Jan 1, 2015, vol. 218, no. Pt 1, pp. 50-58. ISSN 1477-9145; 0022-0949.

TARRY-ADKINS, JL., et al. Poor Maternal Nutrition Followed by Accelerated Postnatal Growth Leads to Alterations in DNA Damage and Repair, Oxidative and Nitrosative Stress, and Oxidative Defense Capacity in Rat Heart. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20120927, Jan, 2013, vol. 27, no. 1, pp. 379-390. ISSN 1530-6860; 0892-6638.

THOMPSON, LP and AL-HASAN, Y. Impact of Oxidative Stress in Fetal Programming. *Journal of Pregnancy*, 2012, vol. 2012.

TOUYZ, RM and BRIONES, AM. Reactive Oxygen Species and Vascular Biology: Implications in Human Hypertension. *Hypertension Research*, 2011, vol. 34, no. 1, pp. 5-14.

TOUYZ, RM., et al. Expression of a gp91phox-Containing Leukocyte-Type NADPH Oxidase in Human Vascular Smooth Muscle Cells: Modulation by Ang II. *Circ Res*, 2002, vol. 90, pp. 1205-1213.

UMANS, JG and LEVI, R. Nitric Oxide in the Regulation of Blood Flow and Arterial Pressure. *Annual Review of Physiology*, 1995, vol. 57, no. 1, pp. 771-790.

VAKKURI, O.; RINTAMAKI, H and LEPPALUOTO, J. Plasma and Tissue Concentrations of Melatonin After Midnight Light Exposure and Pinealectomy in the Pigeon. *The Journal of Endocrinology*, May, 1985, vol. 105, no. 2, pp. 263-268. ISSN 0022-0795; 0022-0795.

VALENTINE, JS., et al. pH-Dependent Migration of Copper(II) to the Vacant Zinc-Binding Site of Zinc-Free Bovine Erythrocyte Superoxide Dismutase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Sep, 1979, vol. 76, no. 9, pp. 4245-4249. ISSN 0027-8424; 0027-8424.

VALKO, M., et al. Redox-and Non-Redox-Metal-Induced Formation of Free Radicals and their Role in Human Disease. *Archives of Toxicology*, 2016, vol. 90, no. 1, pp. 1-37.

VALKO, M., et al. Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007, vol. 39, no. 1, pp. 44-84.

VALKO, M.; MORRIS, H and CRONIN, MT. Metals, Toxicity and Oxidative Stress. *Current Medicinal Chemistry*, 2005, vol. 12, no. 10, pp. 1161-1208.

VEGLIA, F.; CAVALCA, V and TREMOLI, E. Advanced Protocols in Oxidative Stress IISpringer, 2010. *OXY-SCORE: A Global Index to Improve Evaluation of Oxidative Stress by Combining Pro-and Antioxidant Markers*, pp. 197-213.

VEHASKARI, VM; AVILES, DH and MANNING, J. Prenatal Programming of Adult Hypertension in the Rat. *Kidney International*, 2001, vol. 59, no. 1, pp. 238-245.

VEHASKARI, VM., et al. Kidney Angiotensin and Angiotensin Receptor Expression in Prenatally Programmed Hypertension. *American Journal of Physiology.Renal Physiology*, 20040420, Aug, 2004, vol. 287, no. 2, pp. F262-7. ISSN 1931-857X; 1522-1466.

VEHASKARI, VM and WOODS, LL. Prenatal Programming of Hypertension: Lessons from Experimental Models. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20050727, Sep, 2005, vol. 16, no. 9, pp. 2545-2556. ISSN 1046-6673; 1046-6673.

VESKOUKIS, AS., et al. Blood Reflects Tissue Oxidative Stress Depending on Biomarker and Tissue Studied. *Free Radical Biology and Medicine*, 2009, vol. 47, no. 10, pp. 1371-1374.

WASSINK, AM; OLIJHOEK, JK and VISSEREN, FL. The Metabolic Syndrome: Metabolic Changes with Vascular Consequences. *European Journal of Clinical Investigation*, 2007, vol. 37, no. 1, pp. 8-17.

WOODS, LL., et al. Maternal Protein Restriction Suppresses the Newborn Renin-Angiotensin System and Programs Adult Hypertension in Rats. *Pediatric Research*, 2001, vol. 49, no. 4, pp. 460-467.

XU, Y., et al. Hypoxia Or Nutrient Restriction during Pregnancy in Rats Leads to Progressive Cardiac Remodeling and Impairs Postischemic Recovery in Adult Male Offspring. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 20060421, Jun, 2006, vol. 20, no. 8, pp. 1251-1253. ISSN 1530-6860; 0892-6638.

YAMATANI, H.; TAKAHASHI, K and NAGASE, S. Sex Hormones and Physiological Function. *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine*, Apr, 2015, vol. 73, no. 4, pp. 565-570. ISSN 0047-1852; 0047-1852.

YOUNG, IS and WOODSIDE, JV. Antioxidants in Health and Disease. *Journal of Clinical Pathology*, Mar, 2001, vol. 54, no. 3, pp. 176-186. ISSN 0021-9746; 0021-9746.

ZAMBRANO, E., et al. A Low Maternal Protein Diet during Pregnancy and Lactation has Sex-and Window of Exposure-specific Effects on Offspring Growth and Food Intake, Glucose Metabolism and Serum Leptin in the Rat. *The Journal of Physiology*, 2006, vol. 571, no. 1, pp. 221-230.

ZELKO, IN; MARIANI, TJ and FOLZ, RJ. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 2002, vol. 33, no. 3, pp. 337-349.

ZEMAN, FJ. Effects of Maternal Protein Restriction on the Kidney of the Newborn Young of Rats. *Journal of Nutrition*, 1968, vol. 94, pp. 111-116.

ZHANG, L. Prenatal Hypoxia and Cardiac Programming. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, Jan, 2005, vol. 12, no. 1, pp. 2-13. ISSN 1071-5576; 1071-5576.

ZHU, X., et al. Prenatal Hypoxia Enhanced Angiotensin II-Mediated Vasoconstriction Via Increased Oxidative Signaling in Fetal Rats. *Reproductive Toxicology*, 2016.

ZICHA, J and KUNES, J. Ontogenetic Aspects of Hypertension Development: Analysis in the Rat. *Physiological Reviews*, Oct, 1999, vol. 79, no. 4, pp. 1227-1282. ISSN 0031-9333; 0031-9333.

ZOHDI, V., et al. Developmental Programming of Cardiovascular Disease Following Intrauterine Growth Restriction: Findings Utilising A Rat Model of Maternal Protein Restriction. *Nutrients*, 2014, vol. 7, no. 1, pp. 119-152.