

INVESTIGACIÓN
2010



**EFFECTOS DE LA OBESIDAD INDUCIDA
POR SOBREALIMENTACIÓN TEMPRANA
DURANTE LA LACTANCIA SOBRE LA
ISQUEMIA-REPERFUSIÓN CORONARIA**

FUNDACIÓN MAPFRE

www.fundacionmapfre.org

Investigador Principal

Ángel Luis García Villalón

Dr. en Medicina y Cirugía
Catedrático. Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Equipo Investigador

Luis Monje Sánchez

Dr. en Medicina y Cirugía
Profesor Titular. Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Miriam Granado García

Dra. en Farmacia
Profesor Ayudante. Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Nuria Fernández Monsalve

Dra. en Veterinaria
Profesor Titular. Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Índice

	Página
1. INTRODUCCIÓN	4
2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ANIMALES DE 21 DÍAS DE EDAD	4
3. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ANIMALES DE 5 MESES DE EDAD	7
2. CONCLUSIONES	10

1. INTRODUCCIÓN

Conforme a los objetivos de este proyecto, se han estudiado los mecanismos fisiopatológicos de la isquemia-reperfusión coronaria en la obesidad inducida por la sobrealimentación temprana. La sobrealimentación temprana se indujo según el modelo de camadas reducidas. En el momento del nacimiento, 12 camadas se ajustaron a 12 crías por madre y 16 camadas a 3 crías por madre. En el día 21 de la vida se sacrificaron mediante sobredosis de anestesia 13 ratas procedentes de camadas reducidas y 13 de camadas controles, mientras que 22 ratas procedentes de camadas reducidas y 19 de camadas controles se sacrificaron por el mismo procedimiento a los 5 meses de edad. Tras el sacrificio, se extrajo el corazón de las ratas, se canuló la aorta y se perfundió retrógradamente la circulación coronaria con solución fisiológica de Krebs-Henseleit a un flujo de 6-7 ml/min (21 días) ó 10-14 ml/min (5 meses) mediante una bomba peristáltica. Tras un periodo de equilibración de 10 min, en algunos corazones se produjo isquemia deteniendo la bomba de perfusión durante 30 min, seguida de perfusión durante 15 min. Los corazones controles se perfundieron durante un total de 55 min sin producir isquemia. Tras la isquemia-reperfusión o la perfusión durante 55 min en los corazones controles, se precontrajo la circulación coronaria inyectando en infusión continua el análogo del tromboxano A₂ U46619, y cuando la vasconstricción con el U46619 alcanzó un nivel estable, se administró bradiquinina en la circulación coronaria en dosis crecientes (10⁻⁹ -10⁻⁶ M). Al terminar la curva de bradiquinina se continuó la perfusión durante 10 minutos más para lavar las sustancias inyectadas, y a con-

tinuación los corazones se recogieron y congelaron a -80°C. En estos corazones se determinaron los marcadores de apoptosis y supervivencia celular por Western Blot.

2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ANIMALES DE 21 DÍAS DE EDAD

En el momento del destete (21 días) los animales criados en camadas de 3 crías presentaron un aumento significativo tanto del peso corporal como de la cantidad de tejido adiposo visceral y subcutáneo con respecto a los animales criados en camadas de 12 crías. Por el contrario no encontramos diferencias significativas en cuanto a la cantidad de masa magra, según el peso del músculo gastrocnemio (Tabla 1).

La presión de perfusión coronaria fue semejante en los corazones procedentes de ratas de camadas de 3 crías y los de ratas de camadas de 12 crías, en condiciones control o después de la isquemia-reperfusión (Tabla 2). En los corazones controles, la presión intraventricular sistólica fue menor en los corazones de ratas de camadas de 3 crías que en los de ratas de camadas de 12 crías, y para el dP/dt las diferencias entre ambos grupos no fueron estadísticamente significativas. Tras la isquemia-reperfusión tanto la presión intraventricular sistólica como el dP/dt se redujeron significativamente en las ratas de camadas de 12 crías pero no en las de 3 crías (Tabla 2).

En el momento del sacrificio se recogió sangre para el posterior análisis de los niveles de leptina mediante un kit comercial. Encontramos un efecto significativo de la ca-

Tabla 1. Resultados obtenidos en los animales de 21 días de edad.

	Peso corporal (g)	Grasa visceral (mg)	Grasa subcutánea (mg)	Músculo (mg)
Camada de 12 crías control	42.1±1.2	58.6±5.1	238±11.6	368±6.8
Camada de 3 crías	57.3±1.1*	136±10.6*	638±42,1*	385±7.7

* Diferencia estadísticamente significativa (P<0.001).

Tabla 2. Presión.

	Presión de perfusión coronaria (mmHg)	Presión intraventricular sistólica (mmHg)	dP/dt (mmHg/s)
Camada de 12 crías control (n=19)	72±2	106±14	2415±317
Camada de 12 crías tras isquemia-reperfusión (n=15)	66±5	40±11##	909±255##
Camada de 3 crías Control (n=13)	72±2	49±10**	1430±262
Camada de 3 crías tras isquemia-reperfusión (n=10)	68±6	33±9	839±234

** diferencia estadísticamente significativa entre camadas de 12 y 3 crías (P<0.01).

diferencia estadísticamente significativa entre control e isquemia-reperfusión (P<0.01).

mada en los niveles plasmáticos de leptina. Así los animales provenientes de las camadas de 3 crías tenían mayores niveles de leptina que aquellos procedentes de las camadas de 12 crías (Figura 1).

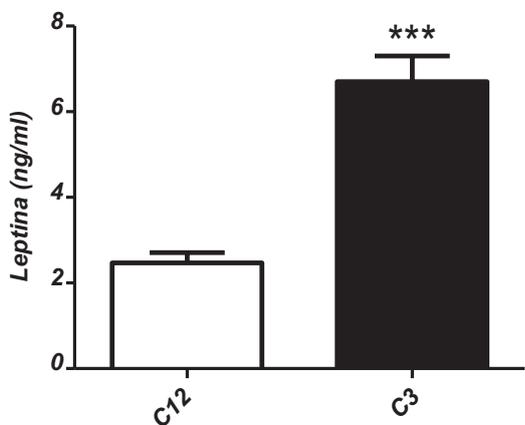


Figura 1. Niveles plasmáticos de leptina en animales de 21 días provenientes de camadas de 12 crías (C12) o de camadas de 3 crías (C3).
*** Diferencia estadísticamente significativa entre camadas de 12 y 3 crías (P<0.001).

Para analizar la respuesta vasodilatadora coronaria dependiente del endotelio, en lugar de acetilcolina como estaba previsto en la memoria del proyecto se ha utilizado bradiquinina pues se encontró que en los corazones de ratas de 21 días de edad esta sustancia producía una dilatación coronaria más reproducible que la acetilcolina. La bradiquinina también produce relajación dependiente del endotelio y se utiliza para el estudio de la respuesta vascular endotelial. La infusión del vasoconstrictor U46619 produjo un aumento de la presión de perfusión, que fue semejante en todos los grupos experimentales (Tabla 3).

Tabla 3. Presión de perfusión coronaria.

	Presión de perfusión coronaria tras precontracción con U46619 (mmHg)
Camada de 12 crías control	123±4
Camada de 12 crías tras isquemia-reperfusión	125±6
Camada de 3 crías control	123±3
Camada de 3 crías tras isquemia-reperfusión	123±5

La inyección de bradiquinina produjo relajación dependiente del endotelio, y esta relajación fue semejante en los corazones de las ratas procedentes de camadas de 3 crías y en los de ratas de camadas de 12 crías, pero se redujo en los corazones después de isquemia-reperfusión comparados con los controles (Figura 2).

Respecto al análisis de los marcadores de apoptosis y supervivencia celular en el miocardio de las ratas de 21 días de edad encontramos que las ratas sobrealimentadas durante la lactancia tenían significativamente mayores niveles procaspasa-8, caspasa -8 activa, Bcl-2 y Hsp-70 que las ratas controles (Figuras 3A, 3B, 3C y 3D respectivamente) mientras que los niveles de Bax elnos eran iguales en ambos grupos de ratas (Figuras 4A y 4B). Por otro lado la isquemia incrementó los niveles de procaspasa-8, caspasa-8 activa, Hsp-70 y Bcl-2 en ambos grupos de ratas, si bien este aumento fue mayor en las ratas sobrealimentadas que en las ratas controles. En cuanto a los niveles de caspasa-6 activa y COX-2 en el miocardio ambos se encontraban incrementados en las ratas procedentes

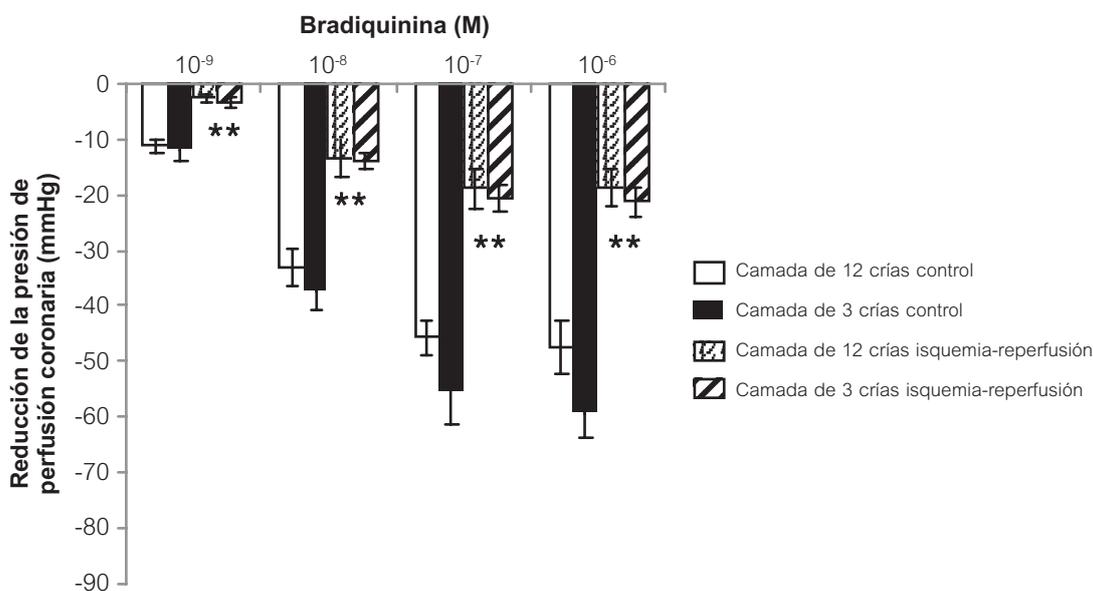


Figura 2. Relajación a la bradiquinina tras precontracción con U46619 en corazones de ratas de 21 días de edad procedentes de camadas de 12 o de 3 crías en condiciones control o después de 30 minutos de isquemia y 15 de reperfusion.
** Diferencia estadísticamente significativa entre control e isquemia-reperfusion (P<0.01).

de camadas de 3 crías con respecto a las criadas en camadas de 12 crías y la isquemia no indujo efectos significativos (Figuras 5A y 5B respectivamente). Por último

los niveles de la caspasa-3 activa eran mayores en el miocardio de las ratas sobrealimentadas con isquemia que los del resto de grupos experimentales (Figura 6).

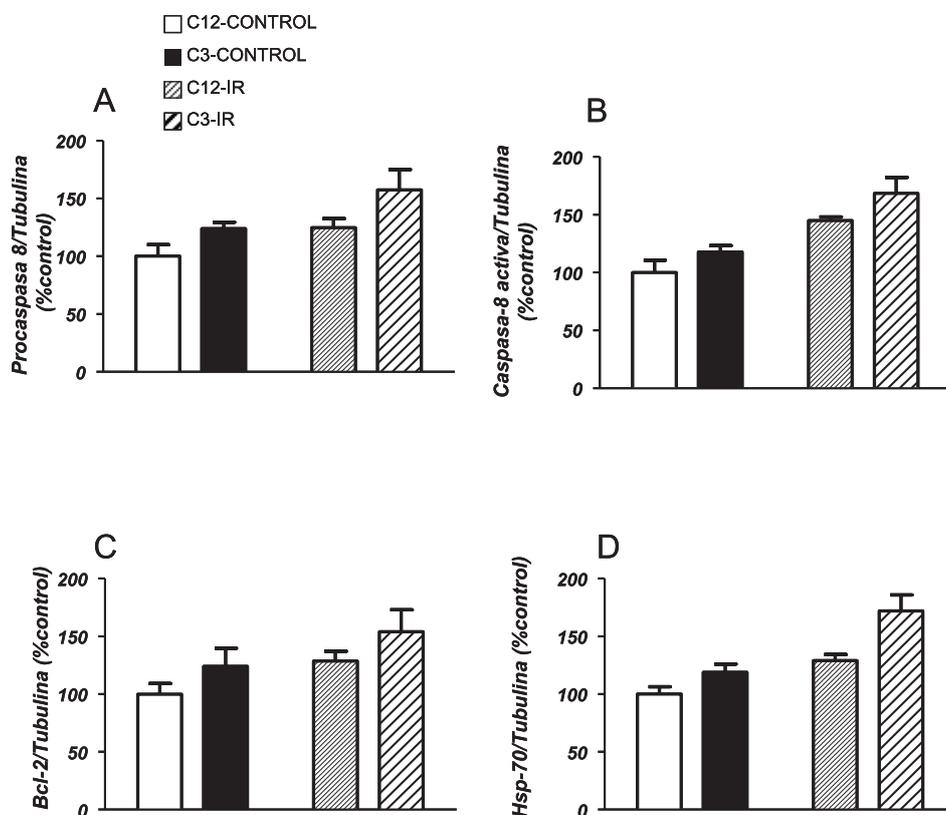


Figura 3. Niveles de procaspasa-8 (A), caspasa-8 activa (B), Bcl-2 (C) y Hsp-70 (D) en el miocardio de ratas de 21 días procedentes de camadas de 3 crías (C3) o camadas de 12 crías (C12) cuyos corazones fueron sometidos a isquemia-reperfusión (IR) o no (CONTROL) en el baño de órganos. Efecto significativo de la camada ($p < 0.05$) y de la isquemia ($p < 0.05$) en todos los casos.

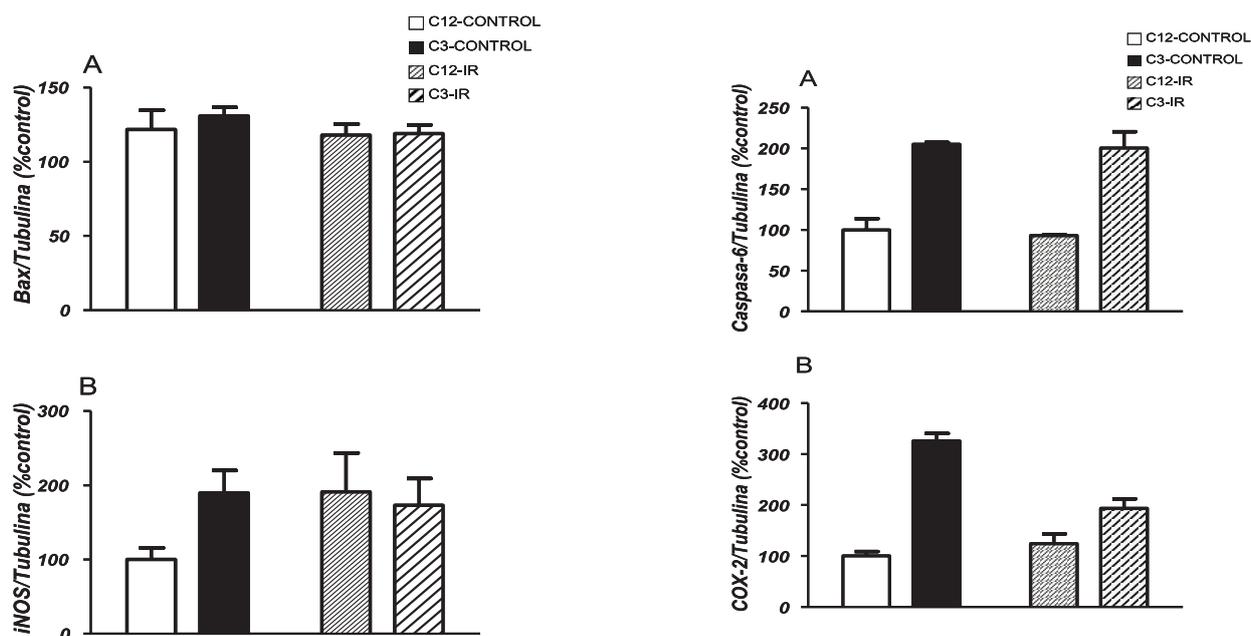


Figura 4. Niveles de Bax (A) e iNOS (B) activa en el miocardio de ratas de 21 días procedentes de camadas de 3 crías (C3) o camadas de 12 crías (C12) cuyos corazones fueron sometidos a isquemia-reperfusión (IR) o no (CONTROL) en el baño de órganos.

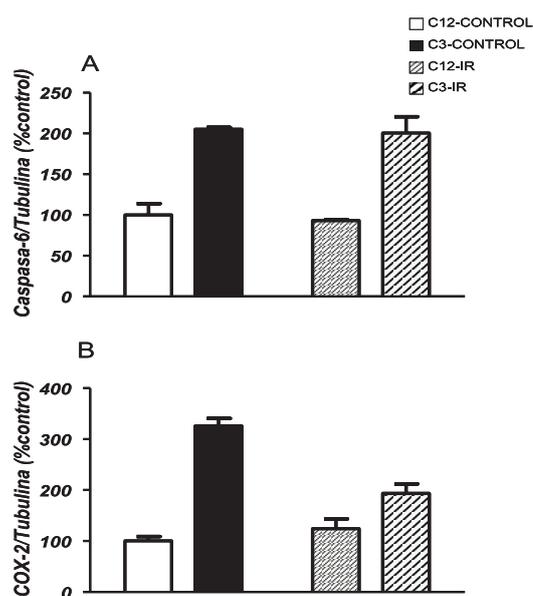


Figura 5. Niveles de caspasa-6 activa (A) y COX-2 (B) en el miocardio de ratas de 21 días procedentes de camadas de 3 crías (C3) o camadas de 12 crías (C12) cuyos corazones fueron sometidos a isquemia-reperfusión (IR) o no (CONTROL) en el baño de órganos. Efecto significativo de la camada ($p < 0.001$) en ambos casos.

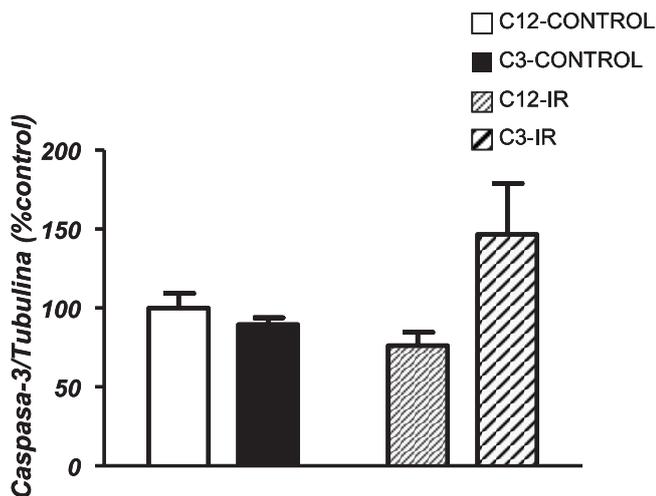


Figura 6. Niveles de caspasa-3 activa en el miocardio de ratas de 21 días procedentes de camadas de 3 crías (C3) o camadas de 12 crías (C12) cuyos corazones fueron sometidos a isquemia-reperfusión (IR) o no (CONTROL) en el baño de órganos. Efecto significativo de la isquemia en las ratas procedentes de camadas de 3 crías ($p < 0.05$).

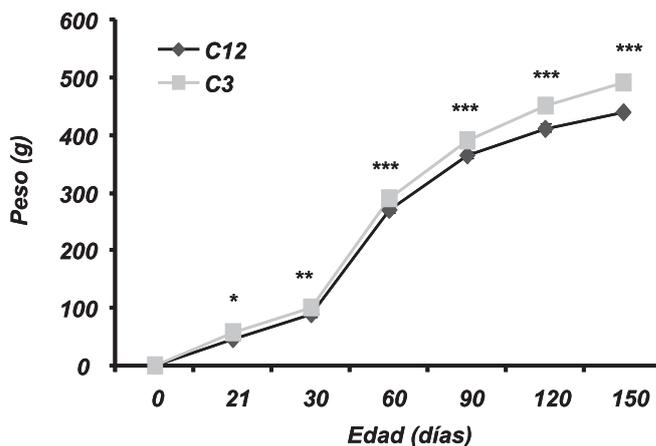


Figura 7. Peso corporal (g) de los animales procedentes de camadas de 12 crías (C12) y de los animales procedentes de camadas de 3 crías (C3) desde el nacimiento hasta los 5 meses de edad. * Diferencia estadísticamente significativa entre camadas de 12 y 3 crías ($P < 0.05$). ** Diferencia estadísticamente significativa entre camadas de 12 y 3 crías ($P < 0.01$). *** Diferencia estadísticamente significativa entre camadas de 12 y 3 crías ($P < 0.001$).

3. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ANIMALES DE 5 MESES DE EDAD

Los animales criados en camadas de 3 crías presentaron una mayor ganancia de peso corporal que los animales criados en camadas de 12 crías a todos los tiempos analizados (Figura 7). A los 150 días de edad, las ratas procedentes de camadas de 3 crías presentaron un mayor porcentaje de grasa visceral y de grasa subcutánea y un menor porcentaje de masa muscular que los animales procedentes de camadas de 12 (Tabla 4). El peso relativo del riñón era mayor y el de las glándulas suprarrenales menor en los animales criados en camadas de 3 con respecto a los criados en camadas de 12 crías/madre (Tabla 4).

Los animales de 5 meses tenían mayores niveles de leptina que los de 21 días, y a los 5 meses los animales provenientes de las camadas de 3 crías tenían mayores niveles de leptina que aquellos procedentes de las camadas de 12 crías ($F = 30.90; P < 0.001$; Figura 8).

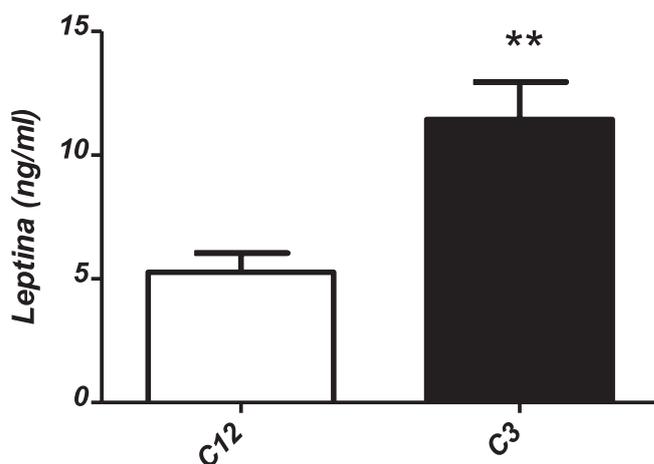


Figura 8. Niveles plasmáticos de leptina en animales de 5 meses provenientes de camadas de 12 crías (C12) o de camadas de 3 crías (C3). ** Diferencia estadísticamente significativa entre camadas de 12 y 3 crías ($P < 0.01$).

Tabla 4. Valores para las camadas de 3 a 12 crías.

	Camada de 12 crías	Camada de 3 crías	
Peso (g)	439 ± 7	491 ± 6	$P < 0,001$
Grasa visceral (mg/100g)	1058 ± 31	1346 ± 51	$P < 0,001$
Grasa subcutánea (mg/100g)	609 ± 23	735 ± 30	$P < 0,01$
Gastrocnemio (mg/100g)	556 ± 7	522 ± 8	$P < 0,01$
Sóleo (mg/100g)	42 ± 1	39 ± 0,9	ns
Corazón (mg/100g)	509 ± 12	496 ± 11	ns
Riñón (mg/100g)	299 ± 4	316 ± 4	$P < 0,05$
Glándulas suprarrenales (mg/100g)	11 ± 0,1	10 ± 0,3	$P < 0,05$

La presión de perfusión coronaria fue semejante en los corazones procedentes de ratas de camadas de 3 crías y los de ratas de camadas de 12 crías, en condiciones control o después de la isquemia-reperfusión. La presión intraventricular fue semejante en las ratas de camadas controles y reducidas, y se redujo tras la isquemia-reperfusión en ambos grupos experimentales, mientras que la dP/dt fue menor en las ratas de camadas de 3 crías comparadas con camadas de 12, y se redujo tras la isquemia en ambos grupos (Tabla 6).

Tras la isquemia-reperfusión o la perfusión durante 55 min en los corazones controles la precontracción con U46619 produjo un aumento de la presión de perfusión que fue semejante en todos los grupos experimentales (Tabla 5), y semejante a la obtenida en las ratas de 21 días.

Tabla 6. Presión de perfusión coronaria.

	Presión de perfusión coronaria tras precontracción con U46619 (mmHg)
Camada de 12 crías control	133±6
Camada de 12 crías tras isquemia-reperfusión	134±4
Camada de 3 crías control	124±7
Camada de 3 crías tras isquemia-reperfusión	141±5

Tabla 5. Presión de perfusión coronaria y presión intraventricular sistólica.

	Presión de perfusión coronaria (mmHg)	Presión intraventricular sistólica (mmHg)	dP/dt (mmHg/s)
Camada de 12 crías control (n=14)	74±2	136±7	3421±218
Camada de 12 crías tras isquemia-reperfusión (n=13)	74±2	67±13**	1431±245**
Camada de 3 crías Control (n=13)	75±1	110±7	2614±209#
Camada de 3 crías tras isquemia-reperfusión (n=12)	78±3	47±7**	772±113**

** Diferencia estadísticamente significativa entre control e isquemia-reperfusión (P<0.01).

Diferencia estadísticamente significativa entre camadas de 3 y camadas de 12 crías (P<0.05).

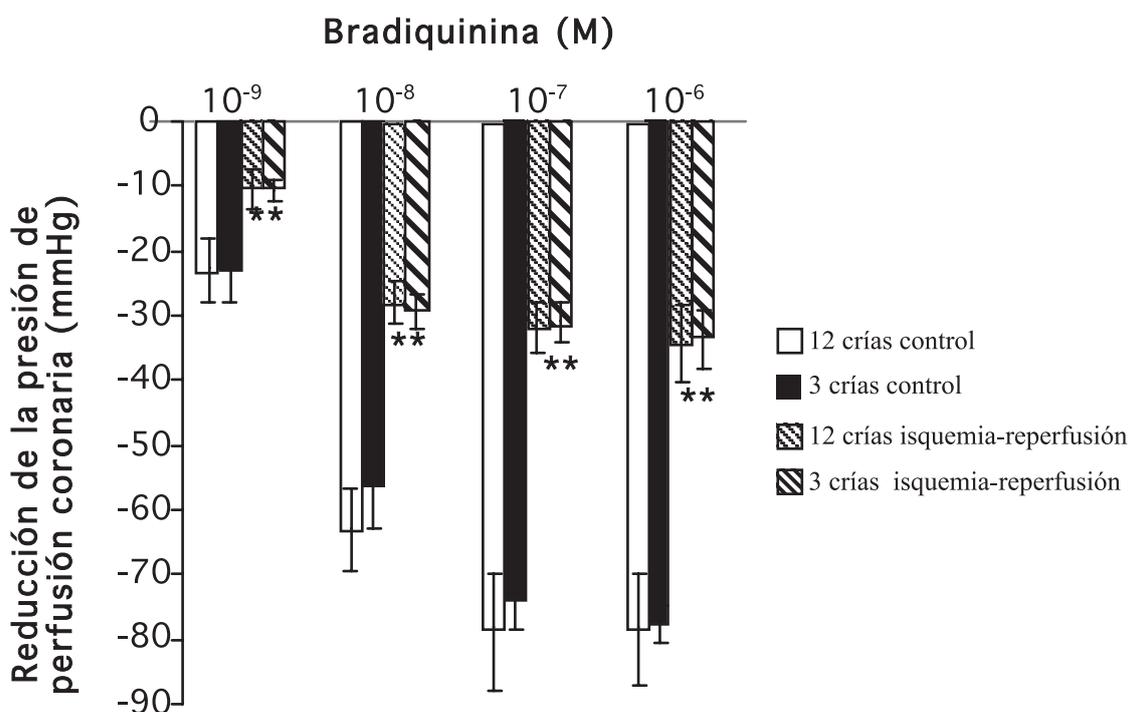


Figura 9. Relajación a la bradiquinina tras precontracción con U46619 en corazones de ratas de cinco meses de edad procedentes de camadas de 12 o de 3 crías en condiciones control o después de 30 minutos de isquemia y 15 de perfusión. ** Diferencia estadísticamente significativa entre control e isquemia-reperfusión (P<0.01). En todos los grupos experimentales, la relajación a la bradiquinina fue mayor en los corazones de ratas de 5 meses que en los de ratas de 21 días en las mismas condiciones experimentales.

Cuando la vasconstricción con el U46619 alcanzó un nivel estable, la inyección de bradiquina (10-9 -10-6 M) produjo relajación dependiente del endotelio, y esta relajación fue semejante en los corazones de las ratas procedentes de camadas de 3 crías y en los de ratas de camadas de 12 crías, pero se redujo en los corazones después de isquemia-reperfusión comparados con los controles (Figura 9).

Respecto al análisis de los marcadores de apoptosis y supervivencia celular en los corazones de las ratas de 5 meses encontramos que ni la camada ni la isquemia produjeron ningún efecto significativo en los niveles de las proteínas proapoptóticas caspasa 3 y Bax y de los marcadores inflamatorios iNOS y COX-2 (Figuras 10A, 10B, 10C y 10D). Sin embargo las ratas procedentes de camadas de 3 crías tenían menores niveles de caspasa-6 activa y procaspasa-8 y mayores niveles de caspasa-8 activa (Figuras 11A, 11B y 11C).

Asimismo la isquemia aumentó los niveles de de los marcadores de supervivencia celular Bcl-2 y Hsp-70 (Figuras 12A y 12B) tanto en las ratas procedentes de camadas de 12 como en las procedentes de camadas de 3, y los niveles de la caspasa-8 activa (Figura 11C). Los niveles de esta proteína fueron mayores en las ratas criadas en camadas de 3 con isquemia que en las ratas criadas en camadas de 12 con isquemia lo que pone de manifiesto que la sobrealimentación temprana induce cambios en el miocardio que perduran hasta la edad de 5 meses haciendo que estas ratas respondan de manera diferente a la isquemia-reperfusión. Sin embargo estos cambios parecen ser menos importantes en las ratas de 5 meses que en las ratas de 21 días.

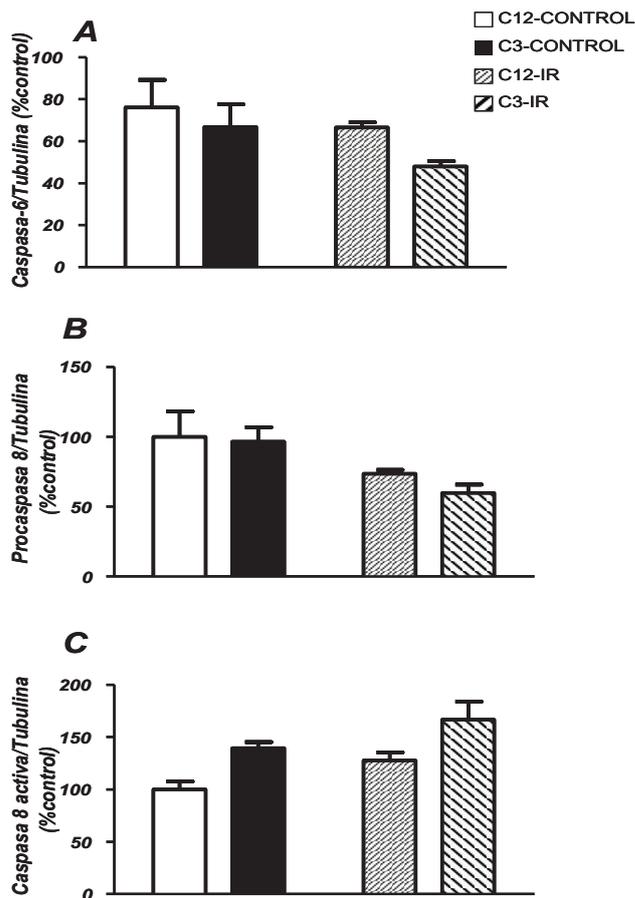


Figura 11. Niveles de caspasa-6 activa (A), procaspasa-8 (B) y caspasa-8 activa (C) en el miocardio de las ratas de 5 meses criadas en camadas de 3 o 12 crías y sometidas o no a isquemia-reperfusión. Efecto significativo de la camada en todos los casos ($p < 0.01$) y de la isquemia en la Figura 11C ($P < 0.05$).

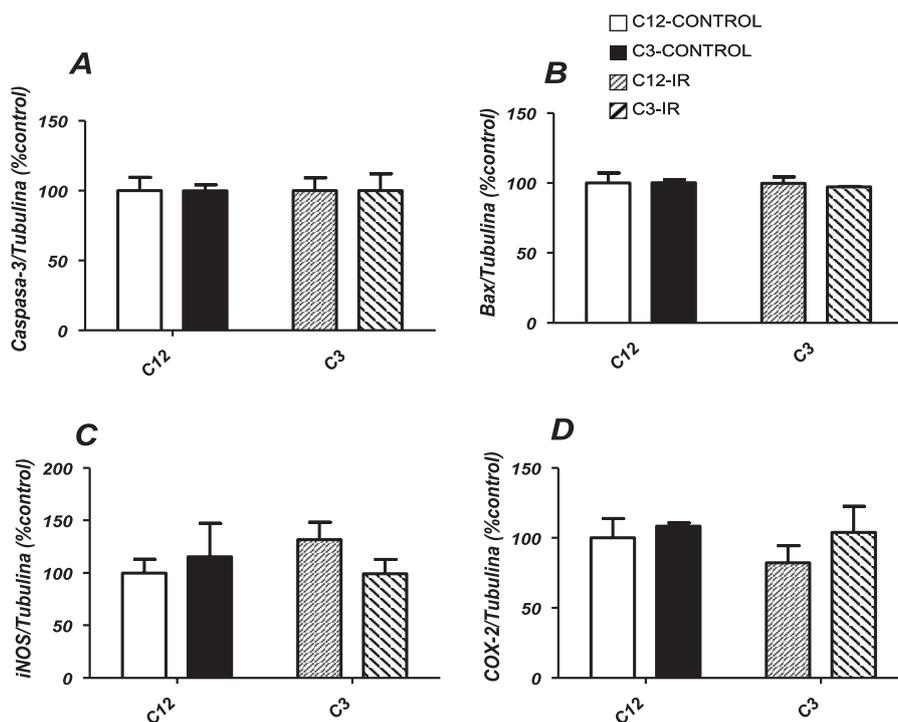


Figura 10. Niveles de caspasa-3(A), Bax (B), Inos (C) y COX-2 (D) en el miocardio de las ratas de 5 meses criadas en camadas de 3 o 12 crías y sometidas o no a isquemia-reperfusión.

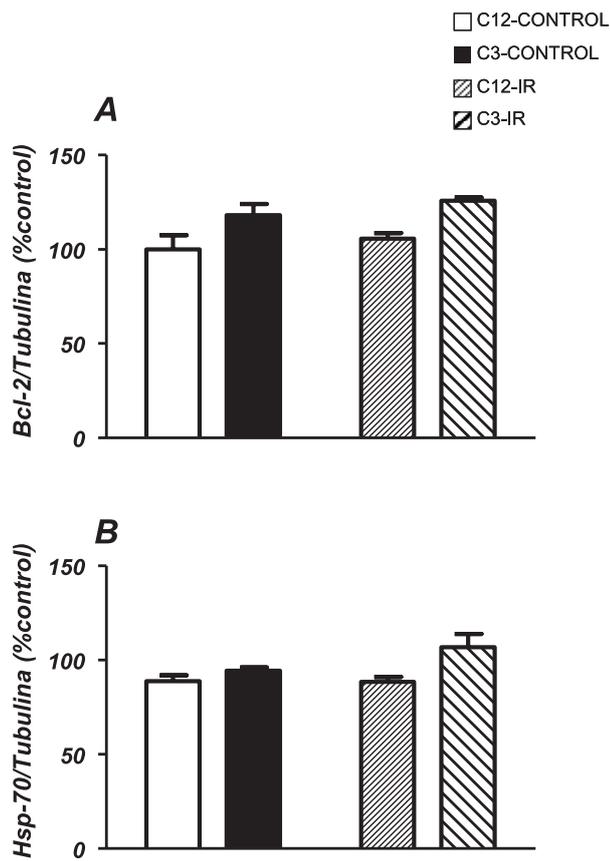


Figura 12. Niveles de los marcadores antiapoptóticos Bcl-2 y Hsp-70 en el miocardio de las ratas de 5 meses criadas en camadas de 3 o 12 crías y sometidas o no a isquemia-reperfusión.

4. CONCLUSIONES

La sobrealimentación temprana induce cambios en los marcadores de apoptosis y supervivencia celular en el miocardio, que se acompañan de una disminución de la capacidad funcional contráctil ventricular. Estas alteraciones podrían estar relacionadas con los cambios en la respuesta a la isquemia en las ratas sobrealimentadas con respecto a las ratas controles. Por el contrario la respuesta vasodilatadora de las arterias coronarias a la bradiquinina no parece afectarse por la sobrenutrición temprana.

Conflicto de intereses

Los autores hemos recibido ayuda económica de FUNDACIÓN MAPFRE para la realización de este proyecto. No hemos firmado ningún acuerdo por el que vayamos a recibir beneficios u honorarios por parte de alguna entidad comercial o de FUNDACIÓN MAPFRE.