



# **UNIVERSIDAD DE MURCIA**

## **ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO**

**Adaptaciones hemodinámicas a la gestación en ratas con hipertensión inducida por alteración de la nefrogénesis. Efectos de una ingesta crónica de grasa.**

**Dña Lidia Oltra Rodríguez  
2022**





# UNIVERSIDAD DE MURCIA

## ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Programa de Doctorado en Integración y Modulación de Señales en  
Biomedicina. Fisiología Médica

*Adaptaciones hemodinámicas a la gestación en ratas con  
hipertensión inducida por alteración de la nefrogénesis.  
Efectos de una ingesta crónica de grasa.*

Memoria presentada para optar al grado de Doctora por:

**Lidia Oltra Rodríguez**

Directores:

**María Teresa Llinás Más**

**Juan Manuel Moreno Ayuso**

2022



*A mi abuela*

*«La vida no es fácil para nadie; pero hay que tener perseverancia y, sobre todo, confianza en uno mismo. Es necesario creer que se está dotado para alguna cosa y que hay que alcanzarla, cueste lo que cueste»*

***Marie Curie***



# AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que han hecho posible cada una de las líneas de esta tesis doctoral, y que de alguna forma han sido partícipes de este duro recorrido aportando lo mejor de sí mismo tanto de forma personal como profesional. Por ello, mis más sinceros agradecimientos a:

Mis directores de tesis: **Juanma** y **Mayte**, por su predisposición, trabajo, esfuerzo y por aportar la calidez científica y sobre todo humana a esta tesis doctoral. Sois mi ejemplo a seguir, por vuestra forma de hacer y de ser. Con vosotros, me he sentido como en casa, formando parte de la bonita familia que habéis construido a vuestro alrededor. Gracias a los dos de corazón.

**Javier Salazar** por acogerme desde el primer momento con tanto cariño, por apoyarme, por instruirme en el mundo de la ciencia con tanta rigurosidad y por recordarme siempre que “*con mi sonrisa puedo conseguir todo lo que me proponga*”, no hay palabras para agradecer todo lo que te debo.

**Nuria**, por ser la principal culpable de esta locura y de muchas otras más. Gracias por contagiarme de tu vitalidad, tus ganas de comerte el mundo y por estar siempre ahí. Hoy soy lo que soy, en parte, gracias a ti. La vida te puso en mi camino y ha sido una muy bonita casualidad.

Mis compañeros de departamento: **Vir**, **Paqui**, **Isabel**, **Mari Carmen** y **María José** por vuestra ayuda y por mostrarme vuestra mejor sonrisa cada día.

**Toni**, mi compañero y amigo. Contigo la ciencia fue una juerga, tanto dentro del laboratorio como fuera.

Mis compañeros de animalario: **Javi**, **Jorge**, **Pepa**, **Marife**, **Fran**, **Maripaz**, **José**, **Edu**, **Tomás** y **Carmen**, por acompañarme en esta aventura.

**Melania**, por ser mis manos, mi otra mitad, mi mejor complemento. Contigo aprendí la fuerza de superación, el trabajo y la constancia. Entraste en mi vida de forma sigilosa y ahora retumbas en ella como un huracán.

**Yolanda**, por ser mi confidente, mi compañera de llantos y risas. En esta etapa has sido todo para mí y desde el primer día que te conocí supe que entrarías en mi corazón para quedarte.

**Paqui y Fina**, mis chicas de la limpieza, gracias por acompañarme y llenarme de alegría esas tardes interminables, por escucharme en mis momentos de más agobio y por ser como unas madres.

**Guillermo**, por esos buenos ratos frente al ecógrafo. Me llevo unas espectaculares imágenes de la vena porta y, además, un amigo.

**Dani Saura**, por esas tardes de ecocardio e inmensas charlas intentando arreglar el mundo. Ha sido un placer poder aprender de ti, tanto de forma profesional como personal. Eres de esas personas que agradeces tropezarte en la vida, gracias.

Mis compañeros de Imasde: **Inma, Santi, Dani, Antonio, Andrés, Pedro Artero, Alfonso, Pedro Javier, Óscar, Héctor, Yolanda, Carolina, Guillermo, Marta, Jaime y Agustín** por acompañarme en mi nueva etapa científica. En especial a ti **Carlos**, por abrirme las puertas al mundo de la avicultura, por indagar en mis inquietudes y hacerlas posibles y por conseguir que ame mi trabajo cada día más.

A mis **padres**, por hacer mis metas las suyas propias. Por darme lo mejor de sí mismos y llenarme de fuerzas para conseguir lo que me proponga. El éxito de cada una de mis etapas es gracias a vosotros.

A mi **hermana**, por ser mi polo opuesto, aquel que me encaja a la perfección.

A mi **familia y amigos**, por vuestro apoyo incondicional en esta y en cada una de mis etapas.

**Ángel**, por ser mi principal apoyo y mi ejemplo a seguir. Eres lo más bonito que me ha dado la ciencia; y si dos tesis doctorales no nos han separado, ya nada podrá hacerlo.



# ABREVIATURAS

ACTA: actina alfa

Ang I, Ang II: angiotensina 1 y 2

Ang-(1-7): angiotensina- (1-7)

ARA: antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> / grupo de ratas gestantes con reducido número de nefronas

ARA-DAG: grupo de ratas gestantes con reducido número de nefronas y alimentadas con una dieta alta en grasa

AT<sub>1</sub>, AT<sub>2</sub>: receptor tipo 1 y tipo 2 de angiotensina 2

BPN: bajo peso al nacer

CIR: restricción del crecimiento intrauterino

CO: monóxido de carbono

COX-1, COX-2: ciclooxigenasa 1 y 2

CRH: hormona liberadora de corticotropina; *corticotropin-releasing hormone*

DAG: dieta alta en grasa / grupo de ratas gestantes alimentadas con una dieta alta en grasa

DNG: dieta con un contenido normal en grasa

ECA: enzimas convertidoras de angiotensina

ECG: electrocardiograma

EDV: velocidad diastólica final; *end-diastolic velocity*

eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial

ERC: enfermedad renal crónica

ET: endotelina

FC: frecuencia cardíaca

FCF: factor de crecimiento de fibroblastos

Fe: hierro elemental

FPER: flujo plasmático efectivo renal

FR: frecuencia respiratoria

FSR: flujo sanguíneo renal

FSU: flujo sanguíneo uterino

GC: gasto cardíaco

HO: hemo-oxigenasa

HO-1, HO-2: hemo-oxigenasa 1 y 2

HO-CO: sistema hemo oxigenasa- monóxido de carbono

HTA: hipertensión arterial

IMC: índice de masa corporal

iNOS: óxido nítrico sintasa inducible

IP: índice de pulsatilidad

IR: índice de resistencia

ISSHP: Sociedad Internacional para el estudio de la Hipertensión en el Embarazo

Kf: coeficiente de ultrafiltración glomerular

KRT: queratina

nNOS: óxido nítrico sintasa neuronal

NO: óxido nítrico

OMS: Organización Mundial de la Salud

PA: presión arterial

PAH: paraaminohipúrico

PAM: Presión arterial media

PAS: presión arterial sistólica

PAS: tinción de peryódico de ácido de Schiff o "*periodic acid-schiff*"

PE: preeclampsia

PG: prostaglandinas

PGE2: prostaglandina E2

PGF2 $\alpha$ : prostaglandina F2 $\alpha$

PIGF: factor de crecimiento placentario; *placental growth factor*

PRF: frecuencia de repetición de pulso; *pulse repetition frequency*

PSV: velocidad sistólica máxima; *peak systolic velocity*

RVR: resistencia vascular renal

RVS: resistencia vascular sistémica

SD: Sprague-Dawley

sFlt-1: tirosina quinasa soluble tipo fms; *soluble fms-like tyrosine kinase-1*

SnMP: mesoporfirina de estaño

SRA: sistema renina-angiotensina

TFG: tasa de filtración glomerular

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; *vascular endothelial growth factor*

VM: velocidad media

VS: volumen sistólico

VTI: velocidad integral en el tiempo; *velocity time integral*



# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>3</b>
<b>1.1</b>	<b>ADAPTACIONES DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR A LA GESTACIÓN</b>	<b>3</b>
1.1.1	Gasto cardíaco	4
1.1.2	Presión arterial	7
<b>1.2</b>	<b>ADAPTACIONES DE LA HEMODINÁMICA RENAL A LA GESTACIÓN</b>	<b>8</b>
<b>1.3</b>	<b>ADAPTACIONES DE LA HEMODINÁMICA UTEROPLACENTARIA A LA GESTACIÓN</b>	<b>11</b>
<b>1.4</b>	<b>MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS ADAPTACIONES HEMODINÁMICAS A LA GESTACIÓN</b>	<b>16</b>
1.4.1	Hormonas	17
1.4.1.1	Esteroides sexuales	17
1.4.1.2	Relaxina	19
1.4.1.3	Prostaglandinas	20
1.4.1.4	Endotelina	21
1.4.2	Óxido nítrico	21
1.4.3	Sistema hemo-oxigenasa	23
1.4.4	Factores angiogénicos	25
1.4.5	Sistema renina-angiotensina	26
<b>1.5</b>	<b>HIPERTENSIÓN EN EL EMBARAZO</b>	<b>28</b>
1.5.1	Gasto cardíaco e hipertensión durante el embarazo	30
1.5.2	Función renal e hipertensión durante el embarazo	31
1.5.3	Hemodinámica uteroplacentaria e hipertensión durante el embarazo	34
<b>1.6</b>	<b>OBESIDAD EN EL EMBARAZO</b>	<b>35</b>
1.6.1	Gasto cardíaco, presión arterial y obesidad durante el embarazo	36
1.6.2	Función renal y obesidad durante el embarazo	37
1.6.3	Flujo sanguíneo uterino y obesidad durante el embarazo	38
<b>1.7</b>	<b>REDUCIDO NÚMERO DE NEFRONAS Y GESTACIÓN</b>	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>47</b>
<b>2.1</b>	<b>OBJETIVO GENERAL:</b>	<b>47</b>
<b>2.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b>	<b>47</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>53</b>
<b>3.1</b>	<b>DISEÑO Y GRUPOS EXPERIMENTALES (OBJETIVOS 1, 3, 4 Y 5)</b>	<b>53</b>
3.1.1	Modelo experimental de reducido número de nefronas	55
3.1.2	Dietas utilizadas	56
<b>3.2</b>	<b>PROTOCOLOS EXPERIMENTALES</b>	<b>56</b>
3.2.1	Estudio ecográfico	57
3.2.1.1	Preparación para la imagen	57

3.2.1.2	Equipo de ultrasonografía y obtención de las ondas de velocidades Doppler...	58
3.2.1.3	Análisis de la onda de velocidades Doppler .....	60
3.2.1.4	Evaluación de la función cardíaca .....	62
3.2.1.5	Evaluación del FSR .....	63
3.2.1.6	Evaluación de la hemodinámica de las arterias uterinas y radiales .....	64
3.2.1.7	Análisis de imagen .....	65
3.2.2	Medida de la TFG en ratas conscientes.....	66
3.2.3	Medición de la presión arterial en ratas anestesiadas.....	67
<b>3.3</b>	<b>DISEÑO Y GRUPOS EXPERIMENTALES (OBJETIVOS 2)</b> .....	<b>68</b>
3.3.1	Grupos experimentales.....	68
3.3.2	Protocolos experimentales.....	70
3.3.2.1	Expresión de HO-1 y HO-2 .....	70
3.3.2.2	Medida de la presión arterial en ratas conscientes crónicamente instrumentadas.....	70
3.3.2.3	Medición de la actividad HO.....	71
3.3.2.4	Inmunohistoquímica .....	71
3.3.2.5	Análisis cuantitativo de la histología de la arteria espiral .....	72
<b>3.4</b>	<b>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>72</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>75</b>
<b>4.2</b>	<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>75</b>
4.2.1	Objetivo específico 1.....	75
4.2.2	Objetivo específico 2.....	79
4.2.2.1	Expresión de HO-1 y HO-2 en la placenta y triángulo mesometrial .....	79
4.2.2.2	Presión arterial en ratas conscientes .....	80
4.2.2.3	Remodelado endovascular asociado a los trofoblastos en el triángulo mesometrial .....	81
4.2.2.4	Velocidad de flujo de las arterias uterinas y radiales. ....	83
4.2.3	Objetivo específico 3.....	85
4.2.4	Objetivo específico 4.....	89
4.2.5	Objetivo específico 5.....	93
<b>4.3</b>	<b>TABLAS</b> .....	<b>99</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>143</b>

# INTRODUCCIÓN





# 1 INTRODUCCIÓN

La gestación es un proceso dinámico, que está asociado a importantes adaptaciones estructurales y fisiológicas en el organismo materno, las cuales van dirigidas a cubrir las demandas metabólicas crecientes de la madre y del feto en desarrollo. Estos cambios comienzan después de la concepción y afectan a todos los sistemas del organismo, pero revierten después del parto con mínimos efectos sobre la madre.

El sistema cardiovascular es uno de los sistemas del organismo en el que se producen los mayores cambios en respuesta a la gestación. Estos cambios conllevan un incremento en el gasto cardíaco (GC) y aseguran una correcta adaptación de la circulación placentaria a las necesidades del feto en desarrollo, garantizando así, tanto su adecuado crecimiento, como el normal funcionamiento del organismo materno. Los riñones y la circulación uteroplacentaria juegan también un papel crítico en la respuesta hemodinámica a la gestación, pues contribuyen en gran medida a los marcados descensos en la resistencia vascular sistémica (RVS), que se producen durante las primeras etapas de la misma, y que son el punto de partida para la adecuada respuesta del organismo materno a los requerimientos crecientes del feto en desarrollo. En este sentido, cualquier alteración de los mecanismos de adaptación del sistema cardiovascular y de los lechos vasculares renal y uteroplacentario, podría tener un efecto muy importante en la adecuada evolución de la gestación y, además, suponer una causa importante de morbilidad fetal y materna.

## 1.1 ADAPTACIONES DEL SISTEMA CARDIOVASCULAR A LA GESTACIÓN

El sistema cardiovascular materno experimenta importantes cambios desde etapas tempranas de la gestación. En torno a las 6 semanas, se produce una marcada vasodilatación y una subsecuente disminución de la RVS, que son el punto de partida para los aumentos en el GC característicos del embarazo. Sin embargo, los incrementos en este parámetro son insuficientes para compensar la importante disminución de las

resistencias periféricas y como consecuencia de ello la presión arterial media (PAM) desciende de forma significativa (Tkachenko et al., 2014).

### **1.1.1 Gasto cardíaco**

La mayoría de los trabajos de investigación que han evaluado los cambios en el GC durante la gestación han descrito aumentos progresivos en este parámetro desde el primer trimestre hasta la semana 20-24 de embarazo, mostrando valores comprendidos entre el 30-45 % por encima de los niveles previos a la gestación (Osol et al., 2019). Por el contrario, después del segundo trimestre, la magnitud y el patrón de cambio de este parámetro ha sido objeto de una gran controversia. Algunos estudios han descrito incrementos progresivos del GC hasta término (Desai et al., 2004; Savu et al., 2012), mientras que otros, han observado una estabilización (Estensen et al., 2013; Sanghavi y Rutherford, 2014) o disminución (Mone et al., 1996) del mismo durante el tercer trimestre.

Aunque parece estar establecido que el incremento del GC durante la gestación está asociado a aumentos tanto de la frecuencia cardíaca (FC) como del volumen sistólico (VS), la contribución relativa de ambas variables a los cambios de este parámetro parece ser diferente a lo largo del embarazo. Muchos autores defienden que los aumentos del GC al comienzo de la gestación se deben principalmente a elevaciones graduales del VS, mientras que los incrementos durante la segunda mitad de la misma, están sobre todo asociados a una mayor FC y a una disminución de la poscarga, secundaria al descenso de la RVS (Chung y Leinwand, 2014). Por otra parte, la FC aumenta desde las primeras semanas de gestación en respuesta a la vasodilatación, y alcanza una meseta en el tercer trimestre mostrando valores de 15 o 20 latidos por encima de los observados antes del embarazo (Sanghavi y Rutherford, 2014).

Los aumentos del VS observados en las etapas tempranas de la gestación son consecuencia de la mayor precarga que se produce por el aumento del volumen sanguíneo característico de la primera etapa del embarazo. La disminución de la RVS a causa de la vasodilatación generalizada, induce una disminución de la presión arterial (PA), la cual activa diferentes mecanismos que tienen como objetivo compensar el bajo nivel de

llenado de la vasculatura materna. El corazón se adapta a estos cambios hemodinámicos mediante un proceso de remodelado que lleva a una dilatación fisiológica de las cavidades cardíacas y un incremento de la contractilidad, que contribuyen de forma adicional a la elevación del VS. El aumento en la dimensión de las cavidades cardíacas o hipertrofia fisiológica se caracteriza por un incremento proporcional en el grosor de la pared (Chung y Leinwand, 2014) a diferencia de lo que ocurre en la hipertrofia patológica.

Aunque los estudios en madres gestantes parecen estar de acuerdo en que el VS aumenta desde etapas tempranas, no parece haber consenso en cuanto a su evolución en la segunda etapa de la gestación. Así, diferentes estudios han descrito tanto aumentos de este parámetro, como su estabilización, o una disminución del mismo en la etapa final del embarazo (Sanghavi y Rutherford, 2014; Soma-Pillay et al., 2016).

La variabilidad en el comportamiento del GC en el tercer trimestre de gestación observada en los diversos estudios, puede explicarse por las diferentes técnicas y diseños experimentales utilizados. Muchas de las técnicas usadas para su medida son consideradas técnicas invasivas y podrían por sí mismas modificar los resultados. Un ejemplo de ello es la técnica de termodilución realizada mediante cateterización de la arteria pulmonar (Lee et al., 2011), que ha sido la técnica de referencia para la medida del GC durante mucho tiempo. Además, se ha utilizado históricamente para determinar la fiabilidad de los nuevos métodos de medida. Sin embargo, es altamente invasiva y se ha dejado de usar en el embarazo por suponer un alto riesgo para la madre y el feto.

En los últimos años se han desarrollado varios métodos no invasivos capaces de determinar el GC de una manera segura. Entre ellos, la ecocardiografía Doppler se ha convertido en una metodología esencial, sin riesgo de radiación, y que permite evaluar la funcionalidad y estructura cardíaca a lo largo de la gestación (Armstrong et al., 2011). A pesar de ello, y como ya se ha citado anteriormente, entre la literatura científica que evalúa los cambios de este parámetro durante la gestación mediante esta técnica, sigue habiendo discrepancias. Esto podría ser debido en parte al diseño de los estudios, puesto que la mayoría de ellos se han llevado a cabo de forma transversal. En este tipo de trabajos no se tiene en cuenta la variabilidad fisiológica individual y esto podría influir en los resultados. Otro factor a considerar dentro del diseño de los protocolos es el valor de referencia. Muchos de los estudios utilizan como valores control los observados en el primer trimestre o en el periodo posterior al parto, lo que no es del todo adecuado puesto

que los cambios cardiovasculares en respuesta a la gestación comienzan durante las primeras semanas (Melchiorre et al., 2012). Todo ello indica que los estudios longitudinales serían los más adecuados para evaluar los cambios hemodinámicos maternos a lo largo de la gestación. Sin embargo, son escasos y suelen recopilar datos de un pequeño número de casos debido a la gran tasa de abandono de las madres. Finalmente, también hay que considerar que, en el segundo y tercer trimestre, el GC es sensible a la posición materna. En posición decúbito supino, el útero comprime la vena cava inferior impidiendo el retorno de sangre al corazón. Esta disminución en la precarga podría llevar a un descenso en este índice de hasta un 30% (Chang y Streitman, 2012). Por ello, la posición materna durante la realización de la ecografía podría influir también en los resultados obtenidos en los diferentes estudios.

Todas las razones anteriores ponen en evidencia las dificultades y limitaciones de los estudios experimentales en mujeres embarazadas y avalan la importancia del uso de modelos animales en las investigaciones relacionadas con la gestación. La mayoría de los trabajos de investigación que han estudiado la respuesta del sistema cardiovascular a la gestación en animales de experimentación, han utilizado metodologías invasivas como las microesferas radiactivas, la implantación de catéteres en la aorta y vena cava para la medida indirecta del GC a través del consumo de oxígeno (Bruce, 1976; Clapp III, 1978) o la técnica de termodilución (Clark et al., 1989; Fiol et al., 1998). Esto ha condicionado los resultados, de manera que los estudios en general, muestran valores puntuales de este parámetro en una etapa concreta de la gestación. Una excepción fue el trabajo de Slangen et al. (1996), en el cual se determinaron los valores de GC a lo largo de la gestación en ratas conscientes, a las que se les había colocado previamente un medidor electromagnético en la aorta ascendente. Los resultados mostraron que este parámetro aumentó desde el día 8 hasta el final de la gestación.

En los últimos años, la ecografía Doppler se ha introducido en los trabajos de investigación con animales, y su uso ha permitido obtener varias mediciones del GC en un mismo animal de manera no invasiva. En ese sentido, se ha observado en ratones, que este aumenta durante la primera y tercera semana de gestación alcanzando valores superiores a los encontrados en ratones no gestantes. Además, los incrementos de este parámetro, obtenidos con ecografía Doppler en estos animales, están asociados a mayores aumentos en el VS que en la FC (Kulandavelu et al., 2006; Wong et al., 2002). Por otra parte, Linke et al. (2002), midieron con esta técnica el GC en ratas grávidas durante la

primera y segunda semana de gestación. Estos autores mostraron que este parámetro aumentó significativamente desde la primera semana, manteniéndose elevado hasta mitad de la gestación. Al igual que ocurría en ratones, estos aumentos se debieron principalmente a incrementos del VS. La ultrasonografía Doppler también se ha utilizado para medir GC en perros. Así, Blanco et al. (2011) analizaron este parámetro en perras gestantes. Estos autores observaron cambios significativos desde el día 40 de gestación hasta el final de la misma, los cuales estuvieron asociados a cambios paralelos en el VS y la FC.

A pesar de que todos estos estudios han demostrado un aumento del GC durante la gestación, los resultados obtenidos ponen de manifiesto la necesidad de llevar a cabo estudios longitudinales adicionales, que utilicen como referencia los valores pregestacionales de los diferentes parámetros. Un conocimiento más exhaustivo de los cambios hemodinámicos en cada etapa gestacional es crucial para entender cómo la presencia de alteraciones cardiovasculares en momentos diferentes de la gestación puede comprometer, en mayor o menor grado, la salud de la madre y el feto.

### **1.1.2 Presión arterial**

La PAM en la mujer gestante comienza a disminuir durante el primer trimestre de gestación (Wong et al., 2002) alcanzando su mínimo valor entre las 24 y 32 semanas. A mediados del tercer trimestre vuelve a aumentar progresivamente hasta alcanzar niveles previos al embarazo (Torgersen y Curran, 2006). El descenso en la PAM se produce a pesar de los significativos aumentos del GC, y a expensas de una disminución predominante de la presión arterial diastólica. Esto es debido al importante descenso de la RVS, que ocurre durante el primero y segundo trimestre.

La RVS decrece a lo largo de la gestación alcanzando su mayor descenso alrededor de la semana 20-28, tras el cual sufre un gradual aumento hasta el final. Algunos estudios han observado que este aumento en la segunda mitad del embarazo alcanza los valores pregestacionales, mientras que otros muestran que a pesar del aumento observado, los valores de la RVS en esta etapa son todavía menores que los previos a la gestación (Melchiorre et al., 2012). Este estado de baja resistencia permite a la vasculatura

acomodar el importante aumento de volumen sin incrementos de la PA. La circulación renal y el lecho vascular uteroplacentario contribuyen de manera esencial a este descenso en la RVS, mostrando una importante vasodilatación y un aumento de la perfusión a pesar de las disminuciones de la PAM. El mecanismo que subyace a esta disminución de la resistencia vascular característico del embarazo parece ser multifactorial, e incluye el desarrollo de la acción de diferentes vasodilatadores, así como el remodelado de la circulación uteroplacentaria (Chang y Streitman, 2012).

Cambios similares de PA a los descritos en mujeres durante la gestación se han observado en varios modelos animales. En la mayoría de los estudios longitudinales llevados a cabo en ratas y ratones gestantes conscientes, tanto la PAM como la presión arterial sistólica (PAS) disminuyeron desde la primera hasta la última semana de gestación (día 18-19 de gestación) (Arikawe et al., 2019; Beauséjour et al., 2003; Carlström et al., 2009; Granger et al., 2001; Kulandavelu et al., 2006; Slangen et al., 1996). Este patrón de cambio de la PA fue similar con las diferentes técnicas de medida usadas (telemetría, catéter arterial y pletismografía). Sin embargo, muy pocos de los estudios citados utilizan como referencia los valores de PA pregestacionales.

## **1.2 ADAPTACIONES DE LA HEMODINÁMICA RENAL A LA GESTACIÓN**

La reducción de la resistencia vascular renal (RVR) es una de las primeras adaptaciones del organismo materno a la gestación. En este sentido, se han documentado (Chapman et al., 1998) aumentos importantes del flujo sanguíneo renal (FSR) y de la tasa de filtración glomerular (TFG) desde la semana 4 de embarazo. Así mismo, Davison y Noble (1981) observaron aumentos del 20% en el aclaramiento de creatinina, incluso en la semana 2 de gestación. Diferentes estudios longitudinales llevados a cabo en mujeres gestantes mostraron que el flujo plasmático efectivo renal (FPER) y la TFG aumentaban significativamente durante la primera mitad de la gestación hasta alcanzar niveles entre 50-85% y 40-65%, respectivamente, superiores a los previos al embarazo. En todos ellos, la TFG se mantuvo elevada hasta el término. Por el contrario, el FPER disminuyó ligeramente en la segunda mitad de la gestación. Por tanto, en general, la fracción de filtración cayó durante la primera mitad del embarazo y después aumentó gradualmente hasta el final. A pesar de que en los trabajos de investigación citados se observó un patrón

similar de cambio del FPER y de la TFG durante la gestación, el porcentaje de aumento de ambos parámetros fue variable. Estas discrepancias podrían deberse, entre otros factores, a los métodos usados para su determinación. En estos estudios la medida del FPER y de la TFG se llevó a cabo mediante aclaramiento de paraaminohipúrico (PAH) e inulina respectivamente, técnicas invasivas que están condicionadas por la postura. Determinadas posiciones durante los experimentos de aclaramiento pueden comprometer el FPER y la TFG debido a la compresión mecánica de los grandes vasos que provoca el útero grávido, especialmente en la segunda mitad de la gestación (Chapman et al., 1998; Lafayette et al., 1999). Además, algunos trabajos también han cuestionado los procedimientos para garantizar el vaciado completo de la vejiga durante los aclaramientos. Mientras que algunos investigadores utilizaron el sondaje vesical (Sims y Krantz, 1958), otros instruyeron a los pacientes para su eliminación de forma espontánea (Dunlop, 1981).

Otra técnica usada en mujeres gestantes para determinar la TFG ha sido el aclaramiento de creatinina. Varios investigadores han comparado las medidas de TFG durante la gestación mediante aclaramiento de inulina con las realizadas mediante el aclaramiento de creatinina de 24 horas en las mismas mujeres (Conrad et al., 2015). Los cambios en este parámetro obtenidos por los dos métodos fueron similares, excepto en las últimas semanas de embarazo. Al contrario que lo que se observaba con el aclaramiento de inulina, el aclaramiento de creatinina de 24 horas disminuía al final de la gestación, reflejando un descenso de la TFG antes del parto. El hecho de que la medida se realice con la orina de 24 horas, implica que puede haber periodos durante el día donde la posición podría comprometer la perfusión renal, y por tanto producir disminuciones en la TFG. Esto explicaría las diferencias con las medidas realizadas mediante la técnica del aclaramiento de inulina, ya que en este caso las determinaciones se realizan con medidas puntuales bajo condiciones determinadas en el laboratorio y en posiciones corporales concretas. Por ello, tanto los efectos del útero grávido sobre la hemodinámica renal, como el inadecuado vaciado de la vejiga y la recolección incompleta de orina en los protocolos de aclaramiento, podrían estar contribuyendo a la variabilidad en el grado de aumento del FPER y la TFG que se observa durante la gestación en todos los estudios citados.

A la vista de todos estos datos, parece claro que el uso de técnicas invasivas en las madres gestantes, el número reducido de estudios longitudinales y el pequeño tamaño de muestra de los mismos, son factores que limitan la interpretación de los resultados y avalan el desarrollo de estudios en modelos animales. En este sentido, la rata gestante ha sido un modelo muy usado para estudiar las adaptaciones de la hemodinámica renal a la gestación. Los primeros estudios de hemodinámica renal se realizaron en ratas gestantes anestesiadas mediante la técnica de micropunción de nefronas corticales, la cual permite determinar la tasa de filtración y el flujo plasmático en una única nefrona. Posteriormente y debido a que los diferentes tipos de anestesia y la manipulación quirúrgica pueden influir en el volumen plasmático, y por tanto alterar la hemodinámica renal, se comenzaron a realizar estudios en ratas conscientes. La TFG se determinó mediante el aclaramiento de inulina o creatinina, mientras que las medidas de FSR se realizaron con el aclaramiento de PAH. Aunque las medidas se realizaron en los animales conscientes, estos fueron sometidos previamente a cirugía para la colocación de diferentes catéteres a través de los cuales se administraron la inulina y el PAH, y se recogieron las muestras de plasma y orina.

La mayoría de los estudios llevados a cabo en ratas gestantes han mostrado incrementos en la TFG durante la primera mitad de la gestación (Alexander et al., 1999; Atherton y Pirie, 1981; Baylis, 1980; Conrad, 1984). Sin embargo, los estudios realizados al final de la misma, aportan resultados menos consistentes. Mientras que algunos autores manifiestan una elevada TFG (Matthews y Taylor, 1960) otros, observan disminuciones de este parámetro (Alexander et al., 1999; Atherton y Pirie, 1981) o no encuentran diferencias con los valores pregestacionales (Churchill et al., 1982; Deng et al., 1996; Kassab et al., 1998; Lichton y Hugh, 1968). Con respecto a los cambios de FSR en la rata grávida, los datos son escasos. En general, los estudios muestran un incremento en este parámetro a mitad de la gestación, pero sin cambios a término (Conrad, 1987; Kassab et al., 1998).



### **1.3 ADAPTACIONES DE LA HEMODINÁMICA UTEROPLACENTARIA A LA GESTACIÓN**

La adaptación de la circulación uteroplacentaria a la gestación es un factor determinante en el incremento de flujo sanguíneo uterino (FSU) que se requiere para satisfacer las necesidades del feto en crecimiento. Se ha estimado que el FSU aumenta durante el embarazo entre 30 y 50 veces con respecto al estado basal en diferentes especies de mamíferos, observándose aumentos de entre 10 y 20 veces en la especie humana. Este incremento tan importante está mediado por los mecanismos de remodelado vascular y por la vasodilatación sostenida del lecho uteroplacentario, además de por los cambios en el GC, que se han descrito previamente. Aunque el remodelado de los vasos de resistencia más pequeños es esencial en el aumento de la perfusión de la placenta, un incremento de flujo tan importante sólo puede ser posible si los vasos de distribución sufren también un aumento considerable en su diámetro (Boeldt y Bird, 2017).

Poco después de la implantación, en el endometrio materno comienza un proceso de decidualización que incluye entre otros cambios, el remodelado de las arterias espirales deciduales, con alteración de las células endoteliales y desorganización de la capa de músculo liso. El inicio de estos cambios parece estar relacionado con el aumento del número de macrófagos y células NK en el endometrio y con su capacidad para secretar factores angiogénicos e inducir apoptosis de las células endoteliales y musculares, así como, con la invasión intersticial del endometrio por células trofoblásticas procedentes del embrión. La desorganización de la capa de músculo liso en los segmentos endometriales de las arteriolas espirales puede llevar a una reducción en la actividad vasomotora y a un aumento del flujo de sangre a la placenta, incluso antes del comienzo de la invasión trofoblástica endovascular (Pijnenborg et al., 2011).

Desde la semana 8 en adelante, se observa también un gran número de trofoblastos en el miometrio interno, cuya función no se conoce en su totalidad. Mientras que, Brosens et al. (2019), han demostrado que estas células pueden tener una acción endocrina, también se las ha asociado con el remodelado de las arterias espirales miometriales, puesto que hay una correlación entre el grado de desorganización del músculo liso vascular y la densidad de trofoblastos intersticiales. El mecanismo exacto de este remodelado temprano todavía es desconocido.

Después de la invasión trofoblástica intersticial de la decidua y el miometrio interno, tiene lugar una segunda invasión endovascular de las arterias espirales miometriales más profundas. La segunda invasión parece tener lugar entre las semanas 14-20 de gestación y desencadena el remodelado de estas arterias. El músculo liso vascular es reemplazado por un material fibrinoide amorfo y desaparece totalmente la lámina elástica, de manera que estas arterias pasan a ser vasos muy dilatados de baja resistencia. Esta transformación da lugar al aumento y ralentización del flujo sanguíneo al espacio intervelloso de la placenta, facilitando el intercambio de gases y nutrientes con la circulación fetal, y protegiendo al mismo tiempo la vasculatura (Boeldt y Bird, 2017).

Al igual que en la especie humana, la rata grávida posee una placentación hemocorial, es decir, el tejido fetal penetra el endometrio hasta el punto de estar en contacto con la sangre materna. Las células trofoblásticas de origen fetal también invaden el miometrio profundo e intervienen en el remodelado de las arterias espirales miometriales. Por ello, la rata se ha considerado un modelo experimental adecuado para el estudio de los mecanismos de decidualización, remodelado uterino y desarrollo fetoplacentario (Fonseca et al., 2012). En la rata, los trofoblastos penetran en la decidua uterina entre el día 14 y 15 de gestación y ocupan el miometrio a medida que avanza la gestación. La invasión vascular del triángulo mesometrial es máxima en el día 18 de gestación y está asociada con la destrucción de la capa de células musculares lisas de las arterias espirales (Ain et al., 2003).

A pesar de que la invasión trofoblástica y el subsecuente remodelado que sufren las arteriolas espirales no ocurre en las arterias radiales profundas, en las arcuatas o en las arterias uterinas, estos vasos sufren también cambios muy importantes, los cuales contribuyen al progresivo aumento del flujo sanguíneo uteroplacentario característico de la gestación (James et al., 2017).

En humanos, cada una de las arterias uterinas se ramifica en unas 8 arterias arcuatas que penetran en el miometrio y forman anastomosis con las arterias arcuatas que proceden de la arteria uterina contralateral (Osol y Moore, 2014). Estos vasos se ramifican posteriormente dando lugar a las arterias radiales que penetran más profundamente en el miometrio donde se ramifican dando origen las arterias espirales (alrededor de 200). En el caso de la rata, las arterias arcuatas y radiales están fuera del útero. Durante la gestación

estos vasos se ramifican y dan también origen a las arterias espirales que irrigan la placenta.

Las arterias uterinas doblan su diámetro en el embarazo, y las arterias arcuatas, que parten de ellas, pueden llegar incluso a superarlas en diámetro alrededor de la semana 20 de gestación (James et al., 2017). Los cambios estructurales en la arteria uterina ocurren desde las primeras semanas de gestación, incluso antes de que comience el aumento en el FSU. El remodelado de las arterias radiales se produce de manera similar, mostrando aumentos de su calibre de entre el 25-220% (Osol y Mandala, 2009). Los incrementos en el diámetro de estos vasos ocurren con escasos cambios en el grosor de la pared vascular, mediante un modelo de remodelado hipertrófico hacia el exterior (*outward hypertrophic*). Debido a que la media ocupa la mayor parte de la pared, el aumento en el lumen se produce por un alargamiento de las células musculares lisas (hipertrofia axial), que va acompañado probablemente de hiperplasia endotelial cubriendo así la mayor superficie luminal del vaso en crecimiento (Boeldt y Bird, 2017).

En la especie humana y en otras especies de mamíferos se produce también la elongación de las arterias uterinas. En mujeres, no se ha determinado si este proceso se produce por el crecimiento longitudinal de estos vasos o por su progresivo estiramiento, ya que los vasos uterinos se caracterizan por su gran tortuosidad. Sin embargo, en roedores (rata y ratón) el crecimiento axial de las arterias uterinas es evidente, de manera que su longitud puede llegar a ser tres veces mayor que en el estado previo a la gestación. En cuanto a las arterias arcuatas y radiales, también sufren elongación, observándose aumentos de longitud de hasta 5 veces en la rata (Osol y Mandala, 2009).

En el tercer trimestre de embarazo, la arquitectura de los vasos uterinos ya está completamente establecida y cualquier aumento adicional del aporte de sangre a la placenta que tenga lugar a partir de este momento pasa a depender de los mecanismos vasodilatadores. El resultado final de estos cambios es un marcado descenso de la resistencia en la circulación uterina que va a determinar la transferencia de una importante proporción del GC materno a la unidad uteroplacentaria garantizando así, el adecuado intercambio de nutrientes, gases y desechos entre la madre y el feto (Chang y Zhang, 2008).

Los primeros estudios que determinaron el FSU en mujeres utilizaron técnicas altamente invasivas (Assali et al., 1960; Metcalfe et al., 1955) entre las que se encuentran

el análisis de la diferencia arteriovenosa de óxido nítrico o la colocación de sondas electromagnéticas directamente sobre la arteria uterina. Estos estudios mostraron que este parámetro aumenta desde un valor basal de entre 20-50 ml hasta 450-800 ml al final del embarazo. Mediciones posteriores mediante la infusión intravenosa de xenón ( $^{133}\text{Xe}$ ) (Rekonen et al., 1976), la tasa metabólica placentaria (Edman et al., 1981), y más recientemente la ecografía Doppler transvaginal o abdominal (Khong et al., 2015) confirmaron estos cambios.

A pesar de que la ecografía Doppler se ha convertido en una herramienta esencial para la evaluación del FSU durante el embarazo, el número de estudios longitudinales que analizan este parámetro a lo largo de la gestación con esta técnica es escaso. La mayor parte de los trabajos de investigación que lo han determinado son transversales, o lo han evaluado en un trimestre concreto del embarazo.

La mayoría de los estudios que han evaluado el FSU mediante ecografía Doppler han usado diversos índices calculados a partir de los valores de las velocidades de flujo de la arteria uterina obtenidas a partir de la onda Doppler. Entre estos índices se incluyen el índice de pulsatilidad (IP), índice de resistencia (IR) y la relación velocidad sistólica máxima/velocidad diastólica final (S/D). Todos ellos se calculan de forma indirecta a partir de la onda de velocidad Doppler y sus variaciones a lo largo de la gestación se asocian en la mayoría de los estudios con cambios de la resistencia o impedancia al flujo en el lecho microvascular distal a la zona de la medición.

Uno de los estudios longitudinales con mayor número de mujeres incluidas fue el realizado por Gomez et al. (2006). Estos autores analizaron mediante ultrasonografía Doppler las ondas de velocidad flujo de las arterias uterinas de 870 mujeres entre las 11-14 semanas y posteriormente entre 19-22 semanas de gestación. Observaron un descenso gradual en el IP durante los dos trimestres de gestación. Sin embargo, este descenso fue mayor al final del primero de ellos, sugiriendo que la hemodinámica uterina sufre cambios más significativos en etapas tempranas de la gestación, que parecen estar relacionados con el remodelado de las arterias uteroplacentarias.

Otros estudios han determinado el flujo en la arteria uterina en la segunda mitad de la gestación usando la misma técnica. Aunque los resultados obtenidos muestran que este parámetro aumenta gradualmente hasta el final del embarazo, el máximo incremento se observó entre la semana 20 y 24, y estuvo acompañado por los mayores aumentos en

el diámetro de la arteria uterina a lo largo de la gestación (Flo et al., 2010; Konje et al., 2001). Entre los escasos estudios que han evaluado la hemodinámica uterina en las primeras semanas de gestación, se encuentra el llevado a cabo por Mäkikallio et al. (2004). Estos autores determinaron la evolución de diferentes parámetros Doppler en las arterias uterinas, arcuatas, radiales y espirales desde la semana 5 a la 10 de gestación. La resistencia de las arterias espirales estimada mediante el IP y la velocidad sistólica máxima o “*peak systolic velocity*” (PSV), disminuyó. Sin embargo, el flujo sanguíneo aumentó desde la semana 5, mientras que la hemodinámica de las arterias uterina y arcuatas no mostró cambios hasta después de la semana 8 de embarazo. En una reciente revisión sistemática se han analizado los resultados de 12 estudios en los que se han evaluado varios parámetros Doppler en las arterias espirales de un importante número de mujeres en diferentes momentos de la gestación. Cuando aplicaron metaanálisis a los resultados obtenidos en estos estudios, los autores encontraron que tanto el IR como el IP de las arterias espirales disminuyeron desde el primer al segundo trimestre, manteniéndose en niveles similares hasta el final de la gestación. En contraste, la PSV aumentó en los dos primeros trimestres y se mantuvo aumentada durante el tercero (Schiffer et al., 2020).

Aunque todos estos estudios sugieren disminuciones importantes en la resistencia vascular uteroplacentaria e incrementos significativos del FSU a lo largo de la gestación que parecen ser más significativos durante los dos primeros trimestres, la escasez de datos en las primeras y últimas semanas del embarazo, junto con la dificultad para comparar los diversos índices y parámetros obtenidos en los diferentes estudios transversales justifican la ausencia de un consenso claro sobre la magnitud y significado de estos cambios en cada etapa del embarazo. Por otra parte, el uso de los diferentes índices, el IP, IR y la relación S/D, a pesar de que es la forma habitual de valorar el flujo sanguíneo uterino en mujeres gestantes, está siendo cuestionado en los últimos años, debido a su amplio margen de variación, sensibilidad y especificidad (Flo et al., 2011). De acuerdo con esta idea, son cada vez más numerosos los estudios que muestran que estos índices calculados a partir de la onda de velocidad Doppler en la arteria uterina no siempre reflejan los cambios de resistencia en la vasculatura uteroplacentaria distal. Todo ello pone en evidencia la necesidad de llevar a cabo estudios longitudinales en modelos animales que permitan determinar la relación existente entre el remodelado de la

vasculatura uteroplacentaria a lo largo de la gestación y los diferentes parámetros hemodinámicos obtenidos con la ecocardiografía Doppler.

El FSU se ha determinado en diferentes modelos animales experimentales durante la gestación. Los primeros estudios que midieron este parámetro en animales emplearon técnicas invasivas como las microesferas (Kone y Baylis, 1997), la técnica del equilibrio de difusión (Clapp III, 1978) o más recientemente, la colocación directa de sondas electromagnéticas en la arteria uterina (Père y Etienne, 2000; Rosenfeld et al., 1996). Estas técnicas han sido reemplazadas por la ecografía Doppler, que actualmente es la técnica no invasiva de elección en la mayoría de las especies, pues permite hacer varias medidas en el mismo animal. La mayoría de los estudios que han analizado la hemodinámica uterina de manera longitudinal a lo largo de la gestación usando la ultrasonografía Doppler se han llevado a cabo en ratones (Hernandez-Andrade et al., 2014; Khankin et al., 2012; Mu y Adamson, 2006; Rennie et al., 2016). Los resultados de estos estudios muestran una disminución del IR y un aumento de la PSV y de la velocidad diastólica final o “*end-diastolic velocity*” (EDV) en la arteria uterina a lo largo de la gestación. Resultados similares se han observado en la arteria uterina y arcuatas de ratas gestantes (Arthuis et al., 2013; Miller et al., 2019). Todos estos resultados indican que el patrón de cambios en la hemodinámica uterina, que se observa en roedores durante la tercera semana de gestación es similar al que muestran las mujeres gestantes al final del primer trimestre, por lo que el uso de la ultrasonografía Doppler en estos modelos animales supone una herramienta esencial para el estudio de los mecanismos implicados en la adaptación de la circulación uterina a la gestación, así como las consecuencias derivadas de las posibles alteraciones en dichos mecanismos.

#### **1.4 MECANISMOS IMPLICADOS EN LAS ADAPTACIONES HEMODINÁMICAS A LA GESTACIÓN**

Numerosos estudios en mujeres y animales gestantes han demostrado que la vasodilatación y la marcada disminución de la RVS que se observan durante las primeras semanas de gestación se producen antes de que la placentación se haya completado, por lo que se han asociado con la acción de varias hormonas y diferentes factores liberados

por el endotelio vascular. Además, la demostrada variación en los niveles de estas hormonas y factores endoteliales a lo largo de la gestación, indica que pueden tener también un papel fundamental en las adaptaciones hemodinámicas que se producen en etapas más avanzadas del embarazo.

## **1.4.1 Hormonas**

### **1.4.1.1 Esteroides sexuales**

Los esteroides sexuales, estradiol y progesterona, son sintetizados por el cuerpo lúteo durante las primeras 10 semanas y posteriormente la placenta se convierte en su fuente principal, de manera que sus niveles son máximos al final del tercer trimestre. Tienen importantes efectos sobre la vasculatura materna, especialmente en las arterias uterinas. A medida que los niveles circulantes de estas hormonas cambian durante el embarazo, también se van modificando sus efectos sobre la función vascular materna (Boeldt y Bird, 2017; Clark et al., 2017).

#### ***1.4.1.1.1 Estrógenos***

El estradiol es el estrógeno predominante y regula numerosos procesos durante la gestación mediante su unión a dos tipos de receptores, ER- $\alpha$  y ER- $\beta$  (Pastore et al., 2012). Durante el embarazo, el estradiol y alguno de sus metabolitos promueven la angiogénesis, vasodilatación, aumento del FSU, disminución de la PA materna y proliferación y diferenciación de las células placentarias (Berkane et al., 2017). Los estrógenos tienen un efecto directo sobre las células endoteliales y musculares a través de vías de señalización rápida y mecanismos genómicos. Diversos trabajos de investigación han demostrado que estas hormonas pueden provocar vasodilatación mediada por un aumento en la síntesis de óxido nítrico (NO) y prostaglandinas (PG) en las células endoteliales, contribuyendo así, a la disminución de la PA característica del embarazo. Además, tienen importantes efectos protectores sobre la vasculatura. Atenuan la respuesta a vasoconstrictores,

inducen la proliferación y migración de las células del músculo liso vascular e incrementan la permeabilidad de los vasos sanguíneos (Hyder y Stancel, 1999).

El estradiol es la hormona angiogénica por excelencia. Los estrógenos son mediadores de la angiogénesis al inducir la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular o “*vascular endothelial growth factor*” (VEGF) y el factor de crecimiento placentario o “*placental growth factor*” (PIGF), regulando la señalización del NO y reclutando en el útero células proinflamatorias y proangiogénicas (Losordo y Isner, 2001), contribuyendo de este modo al remodelado vascular durante la gestación. El estradiol participa también en la proliferación de los trofoblastos y estimula la diferenciación de los trofoblastos vellosos en células sincitiotrofoblásticas (Berkane et al., 2017).

#### **1.4.1.1.2 Progesterona**

La progesterona tiene numerosos efectos sobre el sistema cardiovascular, entre los que se incluyen aumentos del volumen sanguíneo, vasodilatación y protección de los cardiomiocitos frente a la apoptosis. La progesterona es la hormona encargada de asegurar que el miometrio uterino permanezca relajado hasta el final de la gestación. Impulsa la deciduización en el sitio de implantación a través de receptores que se expresan en el endotelio de la decidua. Además, también es capaz de promover la producción de vasodilatadores como el NO y la PGI<sub>2</sub>, mediante la estimulación de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y aumentando la actividad de la ciclooxigenasa 1 (COX-1) (Boeldt y Bird, 2017).

A nivel cardíaco, induce hipertrofia e inhibe la apoptosis de los cardiomiocitos, por lo que puede mediar la hipertrofia fisiológica del corazón materno durante el embarazo (Napso et al., 2018). Los niveles de progesterona aumentan a lo largo de la gestación, elevándose rápidamente a medida que el embarazo se acerca a término. En muchas especies de mamíferos, los niveles de progesterona disminuyen justo antes del parto y esto es asociado con el inicio del mismo. Sin embargo, en los seres humanos, sus niveles continúan siendo altos hasta el nacimiento, por lo que parece que el parto no se inicia por una disminución de la progesterona circulante (Brown et al., 2004).



### 1.4.1.2 Relaxina

La relaxina es una hormona peptídica secretada por el cuerpo lúteo que se detecta en sangre tanto en el embarazo como en la fase lútea del ciclo menstrual en mujeres no gestantes. Además del ovario, existe una expresión local de relaxina y de su principal receptor (RXFP1) en varios tipos de células del tracto reproductivo femenino (endometrio no gestante, células deciduales en el endometrio gestante y en citotrofoblastos y sincitiotrofoblasto) (Conrad, 2011). También se produce en muchos tejidos no reproductivos como el corazón, cerebro, riñón, pulmón, entre otros (Bathgate et al., 2013). En las mujeres embarazadas, la concentración de relaxina circulante alcanza su punto máximo en el primer trimestre, disminuye a partir del segundo y se mantiene disminuida hasta el parto. Por el contrario, en roedores, la relaxina alcanza sus máximos niveles en la última semana de gestación (Napso et al., 2018). Este patrón de síntesis de la hormona en el primer trimestre de gestación se correlaciona con las adaptaciones tempranas que se observan en la circulación uterina en respuesta al embarazo (Anumba et al., 2009), lo que sugiere que la relaxina podría estar implicada en el remodelado de la vasculatura uteroplacentaria. En este sentido, se ha demostrado que ejerce un papel fundamental dentro del útero e interviene en la implantación, la placentación y el mantenimiento del embarazo (Lodhi et al., 2013). En las primeras etapas de la gestación, modula la expresión uterina de genes implicados en la angiogénesis, la acción de las hormonas esteroides y el remodelado vascular (Marshall et al., 2016).

Por otra parte, se ha demostrado que la administración de relaxina en ratas conscientes aumenta la TFG y el FSR, atenúa la respuesta renal a la angiotensina II (Ang II), disminuye la RVS y aumenta el GC, mimetizando los cambios hemodinámicos que ocurren en estos animales durante la gestación (Conrad y Davison, 2014). Además, el bloqueo de los efectos de la hormona con la administración de anticuerpos específicos, previene los cambios en la circulación renal que ocurren en ratas conscientes en respuesta a la gestación. En mujeres con insuficiencia ovárica sometidas a fertilización in vitro o a transferencia embrionaria, en las que los factores producidos por el cuerpo lúteo y entre ellos la relaxina, estaban ausentes, el aumento de la TFG y la disminución de la osmolaridad plasmática característicos del primer trimestre de gestación, fueron menores que los observados en mujeres con ovarios funcionales. Estos resultados sugieren que la relaxina puede contribuir a la adaptación de la vasculatura renal y a la osmorregulación

durante el embarazo (Novak et al., 2001). En este sentido, los niveles séricos de esta hormona aumentan inmediatamente después de la concepción, lo que se corresponde con los grandes incrementos de la TFG y del FSR que se observan durante el primer trimestre.

#### **1.4.1.3 Prostaglandinas**

Los niveles de PG aumentan en el útero y en las membranas fetales, antes y durante el parto (Phillips et al., 2014). Existen muchos factores que afectan a su producción, por ejemplo, sus niveles disminuyen cuando aumenta la progesterona y aumentan con los estrógenos, las citocinas inflamatorias y la hormona liberadora de corticotropina o *corticotropin-releasing hormone* (CRH) (Keelan et al., 2003). La PGE2 y la PGF2 $\alpha$  son producidas por las membranas fetales y otros tejidos intrauterinos, y sus niveles están elevados en el líquido amniótico tanto a término, como durante el parto. Se cree que este aumento en los niveles de PG es un paso crítico en el parto, ya que se ha detectado un marcado aumento en la producción de PGE2 y en la expresión de la ciclooxigenasa 2 (COX-2) en membranas fetales poco antes del parto (Keelan et al., 2003).

La maduración, remodelación y ablandamiento del cuello uterino son procesos esenciales para el inicio y el desencadenamiento del parto. La PGE2, cuya secreción está influenciada por muchas citocinas, también estimula la liberación de IL-8 del tejido cervical, afecta la actividad de la enzima proteolítica e induce la maduración cervical (Keelan et al., 2003). Aunque la placenta produce cantidades considerables de PGD2 antiinflamatoria (Mitchell et al., 1982), las PG antiinflamatorias también intervienen en el mantenimiento del embarazo y en el control del parto. La PGD2 suprime la producción de citocinas proinflamatorias y en la placenta inhibe la producción de IL-6 e IL-8 (Keelan et al., 2003). Por tanto, la PGD2 y sus derivados pueden estar implicados en la remodelación de los tejidos gestacionales, resolución de la inflamación y prevención del parto prematuro.

#### **1.4.1.4 Endotelina**

La familia de las endotelinas (ET) está compuesta por tres isoformas de 21 aminoácidos (ET-1, ET-2 y ET-3), de las cuales, el miembro predominante es la ET-1. La ET-1 es sintetizada y secretada por diferentes células, incluidas las células endoteliales y el sincitiotrofoblastos de la placenta (Saleh et al., 2016). Una vez liberada, actúa principalmente sobre dos receptores acoplados a proteína G de la superficie celular, el tipo A (ET<sub>A</sub>), ubicado principalmente en el músculo liso vascular, y el tipo B (ET<sub>B</sub>) en células endoteliales y células epiteliales renales (Granger et al., 2018).

Diferentes estudios han puesto en evidencia la contribución de la ET a las adaptaciones de la hemodinámica materna a lo largo del embarazo (Gillis et al., 2016; Granger et al., 2018). Se ha demostrado que la administración de un antagonista de los receptores ET<sub>B</sub> del péptido disminuye la vasodilatación y la hiperfiltración renal que ocurren durante la gestación (Granger et al., 2018), aumentando la PA y provocando restricción del crecimiento fetal. Además, Mazzuca et al. (2013) han demostrado que el aumento de la expresión del receptor ET<sub>B</sub> durante el embarazo está asociado con una adecuada vasodilatación y niveles normales de PA. Se ha descrito que la activación de la vía ET / ET<sub>B</sub> puede ser estimulada por la relaxina y otros factores, incluidos los estrógenos, el VEGF y el PIGF (Gillis et al., 2016). Todos estos resultados confirman que la activación de los receptores ET<sub>B</sub> de la ET contribuye a la adecuada evolución de la gestación (Madsen et al., 2001) y es fundamental para mantener una respuesta cardiovascular normal frente al embarazo.

#### **1.4.2 Óxido nítrico**

El NO es un potente vasodilatador que desempeña un papel fundamental en la adaptación vascular al embarazo. Se trata de una molécula lipofílica, inorgánica, sintetizada a partir del aminoácido L-arginina por la acción de tres isoformas del enzima óxido nítrico sintasa (NOS): NOS neuronal (nNOS), eNOS y NOS inducible (iNOS) (Choi et al., 2002). La participación del NO es esencial en los numerosos procesos que

ocurren en la gestación, incluidos la implantación, la remodelación vascular uterina y los descensos de la resistencia vascular periférica (Maul et al., 2003)

Se ha demostrado que los niveles de NO determinados mediante la medida de la concentración de nitratos y nitritos en suero, están significativamente aumentados en mujeres gestantes durante los tres trimestres de gestación (Sutton et al., 2020). Las concentraciones de nitratos y nitritos alcanzan un pico alrededor de la semana 32 de gestación, observándose niveles de 2 a 10 veces superiores que en el primer trimestre o previos al embarazo. Numerosos estudios han demostrado que el NO contribuye significativamente a la vasodilatación característica de la gestación, tanto en mujeres como en animales gestantes. En este sentido, su inhibición en animales gestantes, incrementa la PA y la RVR, provocando también una disminución de la TFG y el FSR (Abram et al., 2001; Danielson y Conrad, 1995; Lis et al., 1996). Así pues, los cambios en la hemodinámica renal y los descensos de la PA durante el embarazo parecen depender en gran medida de la acción vasodilatadora del NO (Leiva et al., 2016).

En la placenta, el NO actúa como un importante agente vasodilatador mediando también el desarrollo placentario al contribuir a los procesos de implantación, invasión de los trofoblastos, adhesión y agregación de plaquetas y perfusión placentaria (Zullino et al., 2018). Es de especial importancia la producción de NO por los trofoblastos extravelosos, que invaden las arterias espirales del útero materno para crear una unidad placentaria eficiente y de baja resistencia y conseguir así, un adecuado flujo sanguíneo fetoplacentario (Khalil y Hardman, 2015; Maul et al., 2003). Además, parece estar implicado en los mecanismos de programación fetal a través de sus efectos sobre los mecanismos epigenéticos que influyen en la maduración de la placenta y en el desarrollo fetal (Zullino et al., 2018). En este sentido, la placenta es fundamental en la programación fetal al regular directamente el flujo sanguíneo, la actividad transportadora y el crecimiento fetal (Jansson y Powell, 2007). Finalmente, se ha demostrado que el NO participa en la vasculogénesis y la angiogénesis, puesto que es un mediador fundamental de potentes agentes angiogénicos como el VEGF, el factor de crecimiento de fibroblastos (FCF) y la angiopoyetina-1 (Huang et al., 2012).

### 1.4.3 Sistema hemo-oxigenasa

La enzima hemo-oxigenasa (HO) presenta dos isoformas, HO-1 y la HO-2, que se originan a partir de genes homólogos no alélicos. Ambas isoformas catalizan la conversión del grupo hemo en tres metabolitos bioactivos: hierro elemental (Fe), bilirrubina y monóxido de carbono (CO). Se ha demostrado que todos ellos tienen funciones fisiológicas distintas (George et al., 2014). El CO es un vasodilatador potente con actividad similar al NO y que contribuye tanto a la regulación de factores angiogénicos como al mantenimiento del tono vascular (Wu y Wang, 2005). La bilirrubina, aunque finalmente se conjuga y se excreta como un producto de desecho, también parece funcionar como un poderoso antioxidante en varios sistemas, al igual que la molécula intermedia biliverdina (McGeary et al., 2003). Por otra parte, el Fe libre se caracteriza por ser una potente molécula prooxidante (Eisenstein et al., 1991).

Varios mecanismos han sido propuestos como mediadores de las acciones del sistema HO sobre las adaptaciones hemodinámicas a la gestación. Bainbridge et al. (2002) demostraron que la producción materna/placentaria de CO podría contribuir a la vasodilatación de los vasos fetales y al mantenimiento del flujo sanguíneo a través de la placenta. Recientes estudios sugieren que la HO puede desempeñar un papel importante en el desarrollo placentario, ya que, durante la gestación, la placenta expresa cantidades significativas de HO-1 y HO-2. Sobre la base de trabajos anteriores que muestran que la HO se expresa en trofoblastos invasivos, varios autores (Lyll et al., 2000; McCaig y Lyll, 2009) encontraron que la administración de protoporfirina-9 de zinc, un inhibidor de ambas isoformas de HO, disminuyó significativamente el potencial de invasión de los citotrofoblastos *in vitro*. Los anticuerpos frente a la HO-1 no afectaron el potencial de invasión, mientras que los anticuerpos frente a la HO-2 sí lo hicieron. Estos resultados sugieren un papel importante de esta isoforma en la regulación de la invasión de los citotrofoblastos y remodelación de la arteria materna. Estudios *in vivo* utilizando la manipulación transgénica de la HO-1 apoyan los resultados obtenidos *in vitro*. Zenclussen et al. (2011) estudiaron cruces de knockouts heterocigotos para HO-1, y encontraron que dentro de las camadas, la pérdida fetal aumentaba en la descendencia HO-1 +/- y lo hacía mucho más en los fetos HO-1 -/-. También encontraron que los fetos con deficiencia de HO-1 tenían una unión de blastocisto defectuosa a la pared uterina y una mayor fibrosis placentaria. De manera prometedora, estos fenotipos podían atenuarse significativamente

por la exposición de la madre a dosis bajas de CO inhalado, lo que implica a este gas como un mediador molecular clave de las acciones protectoras de HO-1 durante el embarazo (Zenclussen et al., 2011). Además de sus acciones sobre la formación de la placenta, también se ha demostrado que HO-1 afecta a la remodelación vascular materna in vivo. Zhao et al. (2011) examinaron la estructura vascular placentaria / uterina de ratones HO-1 +/- . Independientemente del fenotipo HO-1, toda la descendencia exhibió deficiencia en la remodelación de las arterias espirales y defectos en los capilares fetales y espacios sinusoides del laberinto placentario, la región de la interfaz materno-fetal. Esto se asoció con cambios significativos en la producción de factores angiogénicos por la placenta según lo determinado por la matriz de PCR (Zhao et al., 2011). El hecho de que estos cambios se hayan observado independientemente del estado de HO-1 fetal, sugiere que la HO-1 materna también es un factor importante para que la gestación llegue a término. En este sentido, las alteraciones en la actividad de este sistema también se han relacionado con el aborto espontáneo. Un estudio realizado en ratones demostró que el estrés o el aborto inducido por la IL-12 está asociados con una menor expresión placentaria de HO-1 y HO-2 (Zenclussen et al., 2002). Estudios llevados a cabo en humanos, también demostraron que existe una disminución de HO-2 en los trofoblastos y sincitiotrofoblastos de mujeres que sufrieron tanto abortos tempranos como tardíos (Zenclussen et al., 2003). Además, hay evidencias de que la inducción de HO-1 presenta una función protectora en los modelos murinos de aborto inducido por *Brucella abortus* y *Listeria monocytogenes* y que ambas infecciones regulan significativamente a la baja la expresión de HO-1 en la placenta. Trabajos posteriores revelan que la inducción química de HO-1 aumenta la supervivencia fetal y que presenta función citoprotectora en el propio tejido placentario (Tachibana et al., 2011; Tachibana et al., 2008).

Recientemente también se ha demostrado que la administración en la rata de un inhibidor de la actividad de la HO induce aumentos significativos de la PA en la última etapa de la gestación, que están asociados a una disminución del VEGF en la placenta, confirmando de nuevo que este factor proangiogénico podría estar mediando los efectos de la HO durante la gestación (George et al., 2013). Sin embargo, y a pesar de los resultados descritos anteriormente, no se conoce si la HTA inducida por la disminución de la actividad de la HO está asociada a un anormal remodelado de las arterias espirales y a una alteración en los parámetros hemodinámicos en las arterias uteroplacentarias.

#### 1.4.4 Factores angiogénicos

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los existentes y tiene lugar durante el embarazo, la menstruación y la cicatrización de heridas (Heil et al., 2006; Nyberg et al., 2005). El factor proangiogénico VEGF, y en particular su homólogo PIGF, se encuentran entre los factores angiogénicos más estudiados durante el embarazo (Stuttfeld y Ballmer-Hofer, 2009). Entre los miembros de la familia VEGF se incluyen VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y PIGF, además de VEGF-E y VEGF-F, que no se encuentran en los mamíferos (Silasi et al., 2010). El VEGF, normalmente representado por el VEGF-A (Shibuya, 2011), se produce principalmente en células hematopoyéticas, estromales y endoteliales, en respuesta a la hipoxia y a la estimulación por factores de crecimiento, interleucinas o factores de crecimiento derivados de las plaquetas. Se encarga de regular la angiogénesis, la permeabilidad vascular y la homeostasis endotelial (Stuttfeld y Ballmer-Hofer, 2009). El VEGF puede aumentar la producción de ON y prostaciclina a través de varias vías, entre las que se incluyen la vía de la proteína quinasa C, proteína quinasa activada por mitógenos y la vía de la fosfolipasa C (Saarelainen, 2012).

La principal fuente del PIGF es la placenta y este contribuye principalmente a aumentar la función del VEGF-A (Stuttfeld y Ballmer-Hofer, 2009), especialmente durante los procesos de angiogénesis en condiciones patológicas, pero no durante la embriogénesis (Shibuya, 2011). VEGF tiene tres tipos de receptores en mamíferos: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. VEGFR-1 tiene una variante soluble, la tirosina quinasa soluble tipo *fms* o *soluble fms-like tyrosine kinase-1* (sFlt-1), que antagoniza la función de VEGF, impidiendo que se una a las células endoteliales (Jim y Karumanchi, 2017; Silasi et al., 2010). La secreción de sFlt-1 se desencadena por hipoxia a través de un aumento en los niveles de factor de transcripción inducible por hipoxia (Abou El Hassan et al., 2015). Los niveles circulantes de factores pro y antiangiogénicos durante el embarazo están asociados con cambios en la PA (Troisi et al., 2008). En un embarazo sano, el PIGF aumenta continuamente hasta alcanzar un máximo entre las 29 y 32 semanas de gestación, y posteriormente disminuye de manera constante hasta el parto (Redman et al., 2014). Simultáneamente, la sFlt-1 permanece constante (Redman et al., 2014) u ocasionalmente muestra ligeros aumentos inestables (Verlohren, Galindo, et al., 2010) hasta las 29-32 semanas de gestación, y a partir de entonces, muestra un aumento

marcado continuo hasta alcanzar un máximo a término (Redman et al., 2014). El mecanismo por el cual los niveles de PIGF disminuyen después de 29 a 32 semanas sigue sin estar demasiado claro. Es importante destacar que la producción excesiva de sFlt-1 (junto con la producción deficiente de NO debido a la disminución de PIGF) conlleva a una elevación de la PA debido a una mayor sensibilidad de la vasculatura a los vasoconstrictores (Jim y Karumanchi, 2017). Por lo tanto, la disminución de la PA en la primera mitad del embarazo podía deberse también en parte al aumento de los niveles de PIGF.

#### **1.4.5 Sistema renina-angiotensina**

La activación de la vía clásica del sistema renina-angiotensina (SRA) comienza con el angiotensinógeno que es generado por el hígado y secretado a la circulación general en su forma inactiva. La renina escinde proteolíticamente el angiotensinógeno para formar angiotensina I (Ang I). Las enzimas convertidoras de angiotensina (ECA o ECA1) escinden la Ang I para formar la hormona activa, Ang II. Las acciones de Ang II están mediadas por los receptores de angiotensina tipo 1 (AT<sub>1</sub>) y tipo 2 (AT<sub>2</sub>). Durante la gestación, hay un aumento en la actividad del SRA desde las semanas 6-8 de gestación hasta la semana 30. Los niveles de angiotensinógeno aumentan en paralelo a los de estrógenos durante la gestación (Sanghavi y Rutherford, 2014). La activación de este sistema mantiene la PA (Clark et al., 2017) y contribuye a la retención de sodio y agua que se produce en respuesta a la vasodilatación sistémica y renal que genera el estado de bajo nivel de llenado del sistema cardiovascular materno.

A pesar de la activación del SRA desde el inicio de la gestación, durante el embarazo se desarrolla una disminución de la sensibilidad a la Ang II, que modula su efecto vasoconstrictor y conduce finalmente a un estado de vasodilatación. Por lo tanto, las mujeres embarazadas parecen ser menos sensibles a los efectos de Ang II y su PA no aumenta a pesar de los niveles elevados de este péptido, como ocurriría normalmente en una mujer no gestante (Torgersen y Curran, 2006).

Además de la señalización a través del SRA clásico, la Ang I y Ang II se pueden convertir en péptidos más pequeños mediante la vía no clásica del SRA. Más allá de



convertirse en Ang II, la Ang I también puede convertirse en angiotensina- (1-7) (Ang- (1-7) ), que al contrario que la Ang II, tiene acciones vasodilatadoras (Clark et al., 2017).

A pesar de que el SRA ha sido extensamente vinculado a la fisiología renal y a la regulación del volumen sanguíneo sistémico, puede funcionar también a nivel local regulando determinados procesos hemodinámicos, como es el caso de la adaptación hemodinámica uterina a la gestación. Los componentes del SRA, desde los ligandos hasta los receptores de las enzimas proteolíticas que activan el angiotensinógeno, se expresan y se regulan de forma local en los tejidos uterinos. La renina se encuentra en prácticamente todos los componentes de la unidad uteroplacentaria (Skinner et al., 1968). El angiotensinógeno está presente en la placenta y en la decidua humana, y aunque parte de sus niveles pueden proceder del plasma, donde su concentración es muy elevada, otra parte, se produce localmente, ya que se ha demostrado la presencia de su ARNm en la placenta y decidua (Paul et al., 1993). El útero humano, la placenta y los tejidos fetales tienen una alta actividad local de ECA1 (Kalenga et al., 1996). El receptor AT<sub>1</sub> es predominante en la placenta y el AT<sub>2</sub> se expresa en los tejidos fetales y en el aparato reproductor femenino (Nielsen et al., 2000). La Ang- (1-7) actúa a través del receptor MAS, que se expresa en el endometrio humano durante el ciclo menstrual (Vaz-Silva et al., 2009) con un aumento de su expresión al comienzo del embarazo (Yamaleyeva et al., 2013). Los estrógenos aumentan la actividad del SRA uteroplacentario a nivel sistémico y local al incrementar la expresión de angiotensinógeno y de renina (Anton y Brosnihan, 2008).

La Ang II tiene múltiples efectos sobre la remodelación vascular uterina, y estos incluyen la estimulación de la decidualización, la regulación del FSU, la estimulación de la secreción hormonal y la promoción de la angiogénesis y la permeabilidad vascular (Nielsen et al., 2000). Por el contrario, la Ang- (1-7) puede inhibir la angiogénesis. Debido a que Ang II y Ang- (1-7) tienen acciones opuestas sobre la angiogénesis, es probable que el SRA desempeñe un papel en el equilibrio entre las actividades angiogénicas y antiangiogénicas en el útero grávido, y que la relación Ang II/Ang- (1-7) sea esencial para que se produzca una correcta remodelación vascular uterina a lo largo del embarazo.

## 1.5 HIPERTENSIÓN EN EL EMBARAZO

La hipertensión arterial (HTA) complica entre el 5-10% del total de los embarazos y es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna y fetal. La Sociedad Internacional para el estudio de la Hipertensión en el Embarazo (ISSHP) clasifica los desórdenes hipertensivos durante la gestación en:

- **Hipertensión crónica:** es la HTA que aparece antes del embarazo o se diagnostica antes de la semana 20 de gestación, y no se resuelve después del parto.
- **Hipertensión gestacional:** es la HTA que aparece por primera vez después de la semana 20 de gestación, no va acompañada de proteinuria, y desaparece después del parto.
- **Preeclampsia (PE):** es un desorden hipertensivo que se caracteriza por la aparición de HTA después de la semana 20 de gestación acompañada de una o más de las siguientes manifestaciones clínicas: proteinuria o evidencia de daño renal materno, alteraciones hepáticas o neurológicas, hemólisis o trombocitopenia, disfunción uteroplacentaria o restricción del crecimiento intrauterino (CIR).

Entre el 15 y 25 % de mujeres con HTA crónica desarrollan PE (August et al., 2015), aunque el riesgo puede aumentar dependiendo de la duración y severidad de la HTA, así como, por la presencia de alteraciones renales subyacentes. Este desorden se conoce como PE sobreañadida a la HTA crónica. Se diagnostica cuando mujeres con HTA crónica desarrollan cualquiera de las alteraciones características que se han citado anteriormente.

La HTA crónica afecta entre el 1% y 5% de todos los embarazos. El incremento en las tasas de obesidad, así como la tendencia a posponer la edad para tener hijos (Yoder et al., 2009), contribuyen a un progresivo aumento en la prevalencia de la HTA durante la gestación. Dentro de la HTA crónica se incluyen la HTA esencial y la HTA secundaria. La HTA secundaria es menos frecuente que la HTA esencial, y sus causas más comunes son la enfermedad renal, aldosteronismo, hipertensión renovascular, síndrome de Cushing

y feocromocitoma. Se ha estimado que este tipo de HTA complica alrededor del 0.24% de los embarazos (August et al., 2015).

La HTA esencial, a diferencia de la HTA secundaria, es un desorden heterogéneo y poligénico que aparece como resultado de una alteración en la función de diferentes hormonas, proteínas y factores neurogénicos implicados en el control de la PA junto con la influencia de la dieta, el nivel de actividad física y otros factores ambientales. A pesar de la complejidad de los mecanismos que regulan la PA, el papel del riñón en el origen de la HTA esencial es indiscutible. Alteraciones, como una reducida masa renal, disminución de la TFG y una disminución en la capacidad de excreción de sodio se han observado frecuentemente en individuos con HTA esencial (August et al., 2015). Sin embargo, la relación entre estas alteraciones moderadas de la función renal y la evolución del embarazo no ha sido investigada en detalle. Los estudios que analizan la fisiología de la HTA esencial durante la gestación son escasos a pesar de que las mujeres con HTA esencial tienen una alta probabilidad de desarrollar PE.

Las mujeres con HTA esencial normalmente muestran la esperada disminución de la PA característica de la gestación, aunque presentan un aumento en la resistencia vascular periférica cuando se comparan con mujeres normotensas. En las mujeres con HTA esencial que desarrollan PE sobreañadida, la PA puede aumentar al final del segundo trimestre (August et al., 2015). En este sentido, se ha sugerido que la ausencia de una disminución de la PA en el segundo trimestre está asociada con mayores complicaciones gestacionales y es un factor predictivo de PE. Sin embargo, hasta el momento, la razón por la cual solo una determinada proporción de mujeres con HTA esencial desarrollan este desorden es desconocida.

La mayoría de los trabajos de investigación realizados en mujeres gestantes con HTA esencial han demostrado que hasta que desarrollan PE sobreañadida, presentan niveles de hormonas y de otros factores circulantes relacionados con la regulación de la PA similares a los observados en mujeres embarazadas normotensas. Los resultados de un estudio realizado en mujeres con HTA esencial y en mujeres normotensas mostraron que la actividad del SRA fue similar en ambos grupos durante el primer trimestre del embarazo (August et al., 2015). Sin embargo, solo en aquellas mujeres hipertensas que desarrollaban PE se observó una disminución de la actividad de este sistema al principio del tercer trimestre, respuesta que podría indicar un estado de vasoconstricción. En cuanto

a los niveles hormonales, se han descrito disminuciones de estradiol plasmático en mujeres gestantes con HTA esencial no complicada y también en aquellas que desarrollan posteriormente PE. Por el contrario, los niveles de progesterona durante la gestación parecen ser similares en mujeres con HTA esencial, con y sin PE, y en mujeres normotensas.

La PE tiene una incidencia de entre el 3-3.5% de todos los embarazos. A pesar de que su etiología sigue siendo ampliamente debatida, actualmente está generalmente aceptado que la enfermedad se desencadena por una disfunción placentaria, fundamentalmente asociada con una placentación anómala en el caso de la PE temprana, y con una mala perfusión uteroplacentaria en la versión tardía de la enfermedad. A pesar de la escasez de datos sobre las concentraciones de oxígeno en placentas de mujeres hipertensas, la hipótesis actual apunta que la hipoxemia placentaria induce la liberación a la circulación materna de factores inflamatorios y antiangiogénicos, que provocan una disfunción endotelial generalizada, la cual conlleva al inadecuado funcionamiento del corazón, riñones y otros órganos. A pesar de que la presentación clínica de la enfermedad varía dependiendo de que esta aparezca pronto en la gestación (PE temprana) o al final de la misma (PE tardía), la contribución de los sistemas cardiovascular y renal a su fisiopatología es una característica común a las dos manifestaciones de la enfermedad.

### **1.5.1 Gasto cardíaco e hipertensión durante el embarazo**

Estudios recientes sugieren que el análisis de la hemodinámica materna a lo largo de la gestación puede ser de gran importancia para identificar mujeres con riesgo de PE, CIR y otras complicaciones gestacionales. En este sentido, diferentes estudios han demostrado que las mujeres que desarrollan PE temprana (<34 semanas de gestación) presentan un menor GC y una mayor resistencia vascular total en el primer (Gagliardi et al., 2017) y segundo trimestre de embarazo (Valensise et al., 2008) que mujeres con una gestación normal. Sin embargo, aquellas que desarrollan PE tardía ( $\geq$ 34 semanas) presentan niveles de GC mayores y una menor resistencia vascular que mujeres gestantes controles en el segundo trimestre de gestación (Valensise et al., 2008). Además, Foo et al. (2018) observaron en un cohorte de 356 mujeres sanas, que aquellas que sufrieron PE y/o CIR mostraban patrones pregestacionales de función hemodinámica diferentes a las

mujeres con un embarazo normal. Se han observado también patrones hemodinámicos diferentes entre mujeres con HTA gestacional y PE (Borghí et al., 2011; Pisani et al., 2017). Pisani et al. (2017) demostraron que mujeres que presentaban aumentos significativos de la resistencia vascular total desde el primer trimestre de embarazo asociados a un bajo porcentaje de masa grasa, reducido volumen plasmático y circulación hipodinámica tenían un alto riesgo de desarrollar PE, mientras que aquellas que presentaban alta resistencia vascular y un mayor porcentaje de masa grasa en el segundo trimestre tenían un mayor riesgo de retención excesiva de fluido y de sufrir HTA gestacional. Borghi et al. (2011) compararon el patrón hemodinámico cardiovascular en mujeres con diferentes desórdenes hipertensivos al comienzo del tercer trimestre de gestación. Estos autores concluyeron que la PE, y en menor extensión la HTA crónica, estarían relacionadas con las mayores alteraciones en la función cardiovascular a pesar de niveles comparables en PA. Por el contrario, las mujeres con HTA gestacional presentaban las alteraciones hemodinámicas más leves.

Todos estos resultados apuntan a que el análisis de la hemodinámica materna desde etapas tempranas del embarazo puede ser una buena herramienta para identificar mujeres con riesgo de PE y para determinar el inicio de la enfermedad. Sin embargo, son necesarios más estudios longitudinales que evalúen la hemodinámica materna a lo largo de la gestación en mujeres con HTA crónica.

### **1.5.2 Función renal e hipertensión durante el embarazo**

La HTA crónica en mujeres jóvenes, no diabéticas y sin obesidad está causada fundamentalmente por alteraciones renales. La gestación en estas mujeres puede agravar la enfermedad renal preexistente, la cual a su vez puede tener efectos adversos importantes sobre la evolución del embarazo y el desarrollo fetal. En este sentido, las mujeres hipertensas con enfermedad renal previa a la gestación tienen un alto riesgo de desarrollar PE, y otras complicaciones, como partos prematuros y CIR. Además, la mayoría de mujeres que presentan un grado leve de enfermedad renal antes del embarazo muestran menores aumentos de la TFG durante la gestación que los observados en mujeres gestantes sanas (Baylis, 2003). En general, hay considerables evidencias que indican que los efectos adversos de la gestación sobre la función renal van a depender del

grado de severidad de la enfermedad renal previo al embarazo, más que del tipo de enfermedad (Baylis, 2003).

Como ya se ha citado anteriormente, la HTA crónica complica entre el 1 % y el 5% de los embarazos. Sin embargo, estas cifras podrían estar subestimadas, puesto que en las primeras semanas de embarazo la PA tiende a disminuir tanto en mujeres normotensas como en la mayoría de mujeres hipertensas, por lo que la HTA crónica puede pasar desapercibida y ser erróneamente diagnosticada como PE posteriormente. Además, la hiperfiltración característica de las primeras etapas de la gestación también podría enmascarar alteraciones moderadas de la función renal, y por tanto impedir el diagnóstico temprano de enfermedad renal. Por todo ello, en la mayoría de los casos de HTA crónica con enfermedad renal subyacente, es difícil hacer un diagnóstico diferencial entre una exacerbación de la enfermedad renal durante la gestación y el desarrollo de PE sobreañadida.

El riñón es uno de los órganos más afectados en PE. Las mujeres que presentan este desorden sufren alteraciones importantes en la hemodinámica renal. Conrad y Lindheimer (1999) recopilaron datos de 23 estudios en los que se comparaba la hemodinámica renal de mujeres con gestación normal y mujeres con esta enfermedad. En todos los estudios, excepto en uno, la TFG y el ERPF fueron menores (con un descenso medio de 32% y 24%, respectivamente) en las mujeres con PE. En 9 de estos 23 estudios, se incluyeron, además, los valores de estos parámetros en mujeres no gestantes. Los resultados mostraron que las mujeres con PE presentaban los valores menores de TFG y de ERPF. Tanto en los estudios citados, como en otros más recientes, se ha observado también que los descensos de la TFG que se producen en esta enfermedad generalmente exceden a los que ocurren en el ERPF, sugiriendo que la disminución de la TFG puede deberse parcialmente a una disminución en el coeficiente de ultrafiltración glomerular. En este sentido, Irons et al. (1997) calcularon el coeficiente de ultrafiltración glomerular en un grupo de mujeres con gestación normal y en otro grupo de mujeres con PE. Utilizando los análisis simultáneos de los valores de los aclaramientos de inulina, PAH y dextranos, estos autores determinaron que el coeficiente de ultrafiltración glomerular era un 50% menor en el grupo de mujeres con este desorden hipertensivo. Resultados similares fueron obtenidos posteriormente por Lafayette et al. (1998) un día después del parto. A pesar de que el mecanismo o mecanismos responsables de estas alteraciones en la hemodinámica renal permanecen sin determinar, la disfunción endotelial característica

de la enfermedad parece tener un papel esencial en la alterada respuesta renal a la gestación en mujeres con PE. La lesión renal característica de esta enfermedad es la endoteliosis glomerular, que consiste en la aparición de edema en el endotelio glomerular, con pérdida de fenestraciones endoteliales y disminución de la luz de los capilares glomerulares junto con un engrosamiento de la membrana basal glomerular (Stillman y Karumanchi, 2007). Estos cambios histológicos provocan alteraciones en la permeabilidad capilar glomerular y reducen el área de filtración dando lugar a un descenso de la TFG (Hussein y Lafayette, 2014). Inicialmente se pensó que el edema en las células endoteliales y la pérdida de fenestraciones endoteliales eran también la causa de la proteinuria que se observa en una gran proporción de los casos de PE. Sin embargo, cada vez son más las evidencias que indican que la lesión de los podocitos contribuye significativamente a la proteinuria característica de la enfermedad (Armaly et al., 2018). La hipótesis que se plantea es que el desequilibrio entre factores proangiogénicos y antiangiogénicos provoca una disfunción endotelial sistémica que afecta también al riñón. El VEGF es importante para el mantenimiento de los podocitos y de la función glomerular, de manera que cuando los niveles de sFlt-1 son elevados, disminuye la viabilidad del VEGF y esto provoca lesiones en estas células, las cuales pierden sus interdigitaciones y se separan de la membrana basal glomerular. En ausencia de un funcionamiento adecuado de los podocitos se producen también alteraciones en las células endoteliales y finalmente se daña la barrera glomerular apareciendo glomeruloesclerosis y proteinuria.

Dado que la disfunción endotelial es una causa común de PE y enfermedad renal, y teniendo en cuenta que ambas patologías comparten proteinuria e HTA, el diagnóstico de PE en mujeres con enfermedad renal y/o HTA crónica previa a la gestación, es casi imposible en los casos en los que la enfermedad renal se manifiesta por primera vez durante la gestación o en aquellos en los que no existen datos de PA y función renal antes de la semana 20. Por ello, la detección de la enfermedad renal es de vital importancia, ya que en muchos casos es completamente asintomática y la gestación puede ser la primera oportunidad para un diagnóstico temprano, que debería sospecharse en presencia de HTA crónica previa o en los casos en los que la HTA se desarrolla en etapas muy tempranas del embarazo.

### 1.5.3 Hemodinámica uteroplacentaria e hipertensión durante el embarazo

Numerosos estudios realizados en mujeres gestantes utilizando la técnica de ultrasonografía Doppler han demostrado que los diferentes desórdenes hipertensivos del embarazo están asociados con aumentos significativos de la resistencia de la arteria uterina y disminuciones del FSU en los tres trimestres de embarazo. Sin embargo, el patrón de estas alteraciones a lo largo de la gestación parece ser específico del tipo concreto de trastorno hipertensivo (Gyselaers et al., 2019). La determinación del IP y el IR de la arteria uterina en diferentes estudios realizados en mujeres gestantes parece indicar que la alteración de estos parámetros en etapas tempranas de la gestación está correlacionada generalmente con una mayor probabilidad de desarrollar PE temprana (Gyselaers et al., 2019; Sharma et al., 2018). Por el contrario, la aparición *de novo* de valores anormales en estos índices en el tercer trimestre predispone al desarrollo de PE tardía (Binder et al., 2018). Según estos autores los índices de impedancia de la arteria uterina determinados por ultrasonografía Doppler reflejan la resistencia vascular de la circulación uteroplacentaria y se han relacionado clásicamente con el grado de invasión de las arterias espirales por los trofoblastos. Sin embargo, la aparición *de novo* de valores anormales de estos índices en el tercer trimestre apunta a que la alteración de los mismos podría estar relacionada, además de con una invasión trofoblástica anómala, con una inadecuada adaptación de la circulación sistémica materna a la gestación.

Como se ha mencionado anteriormente, la HTA crónica es un factor de riesgo importante para el desarrollo de PE. Sin embargo, los estudios que han analizado el patrón de cambios del FSU a lo largo de la gestación en mujeres con HTA previa al embarazo, son escasos. Se ha demostrado que las mujeres con HTA crónica muestran una menor vascularización de la placenta y un menor PSV de la arteria uterina en el segundo y tercer trimestre de embarazo (Altorjay et al., 2017). Además, Panaitescu et al. (2017) determinaron el IP de la arteria uterina al final del primer trimestre de gestación en mujeres con y sin HTA crónica que desarrollaron PE. Estos autores observaron que este índice fue menor en mujeres con HTA crónica que desarrollaban esta enfermedad que en aquellas que la presentaban sin HTA previa, por lo que concluyeron que en estas últimas su aparición estaba asociada a mayores aumentos en la resistencia de la arteria uterina



sugiriendo que el desarrollo de PE podría estar asociado a mecanismos diferentes en ambos grupos.

A pesar de que un porcentaje importante de mujeres con HTA crónica desarrolla PE durante la gestación, hay una gran proporción de estas mujeres que no lo hacen. Estos resultados ponen de manifiesto la necesidad de futuros estudios que analicen longitudinalmente los cambios en la hemodinámica uteroplacentaria a lo largo del embarazo en mujeres con HTA crónica y que permitan determinar los mecanismos que llevan al desarrollo de PE en estas mujeres.

## **1.6 OBESIDAD EN EL EMBARAZO**

La obesidad es un grave problema de salud pública. En el año 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) notificó que el 39% de la población adulta, por encima de 18 años, sufría sobrepeso y el 13% presentaban obesidad. El aumento en la incidencia de obesidad ha sido más significativo en mujeres en edad reproductiva, de manera que se han observado aumentos de entre 0.5 y 1 kg cada año desde la adolescencia hasta la mediana edad. Globalmente, el número estimado de mujeres embarazadas con sobrepeso u obesidad fue de 8.9 y 14.6 millones respectivamente en 2014. En España, más del 50 % de la población adulta tiene sobrepeso o padece obesidad, y en los últimos años se ha detectado un notable aumento de la prevalencia de ambos desórdenes en mujeres con edad reproductiva (Otero-Naveiro et al., 2021).

La obesidad materna está estrechamente relacionada con diversas complicaciones, entre las que se incluyen la diabetes gestacional, altas tasas de cesárea, CIR y desórdenes hipertensivos como la HTA gestacional y la PE. Se ha observado que incluso el sobrepeso moderado es un factor de riesgo para la aparición de HTA y PE durante la gestación (Reichetzeder, 2021). En mujeres obesas, la incidencia de HTA es 2.2–21.4 veces superior que en mujeres sanas y entre 1.22–9.7 de las ocasiones suele cursar con PE (Galtier-Dereure et al., 2000). Además de las alteraciones descritas, la obesidad materna está también asociada a diferentes complicaciones fetales entre las que se incluyen abortos, nacimientos prematuros, asfixia fetal, así como un mayor riesgo de dar a luz bebés tanto con bajo como con alto peso para su edad gestacional (Lewandowska et al.,

2020). Estas alteraciones en el desarrollo fetal pueden tener importantes consecuencias a largo plazo puesto que se han relacionado con una mayor probabilidad de sufrir enfermedades cardiovasculares en la edad adulta.

### **1.6.1 Gasto cardíaco, presión arterial y obesidad durante el embarazo**

La obesidad tiene efectos negativos importantes sobre la función cardíaca, la vasculatura y el endotelio. Cada 100 g de grasa depositada en el organismo, produce aumentos del GC de entre 30–50 ml/min que van acompañados de un aumento en el volumen sanguíneo. La sobrecarga de volumen provoca inicialmente hipertrofia ventricular izquierda, y posteriormente el miocardio se va dilatando para compensar la sobrecarga de presión, parcialmente mediada por el aumento de la actividad simpática debido a los efectos potenciadores de hormonas como la leptina, insulina y varios mediadores inflamatorios. En respuesta a la obesidad, la FC también aumenta, y esto provoca una disminución del intervalo diastólico y del tiempo de perfusión miocárdico que a largo plazo conduce a la disfunción cardíaca. Además, la conducción y la contractilidad cardíaca pueden verse aún más comprometidas cuando se produce un depósito de grasa en el tejido miocárdico (Schlabritz-Loutsevitch et al., 2016; Vinayagam et al., 2017; Yu et al., 2006).

Los estudios que han analizado los efectos de la obesidad sobre las adaptaciones del sistema cardiovascular y la regulación de la PA a lo largo de la gestación son escasos. Varios estudios llevados a cabo en mujeres obesas gestantes coinciden en que la obesidad interfiere en la adecuada respuesta del sistema cardiovascular al final del embarazo (Buddeberg et al., 2019; Veille y Hanson, 1994). En un estudio reciente (Vonck et al., 2019) llevado a cabo en mujeres gestantes con índice de masa corporal (IMC)  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup> previo al embarazo, se ha observado que el GC disminuye en el tercer trimestre de gestación, a diferencia de lo que ocurre en el grupo de mujeres gestantes de peso normal, en las cuales, el aumento de este parámetro se mantuvo hasta el final de la gestación. La disminución del GC en el último trimestre estuvo asociada a un aumento de la PA y a un estado de sobrecarga de volumen que sugiere una inadecuada adaptación del sistema cardiovascular en la última etapa del embarazo. Por otra parte, también se ha observado que una mayor ganancia de peso a lo largo de la gestación aumenta la probabilidad de

sufrir trastornos hipertensivos (Gaillard et al., 2011; Yu et al., 2006). Pero en general, la mayoría de los estudios en mujeres gestantes, analizan solo una etapa concreta de la gestación y no muestran resultados demasiado concluyentes.

Del mismo modo, son también limitados los trabajos realizados en modelos animales. Hayes et al. (2012), llevaron a cabo un estudio en ratas gestantes alimentadas con una dieta alta en grasa (DAG) durante 16 semanas antes de la gestación. Las ratas alimentadas con la DAG mostraban un aumento de peso de alrededor de un 22% con respecto a las ratas control y valores de PA más elevados antes de la gestación. Además, presentaron mayores aumentos en este parámetro durante el curso del embarazo. Por otra parte, también se ha demostrado en ratones, que una alta ingesta de grasa antes y durante la gestación, aumenta la hipertrofia cardíaca y el remodelado patológico de este órgano después del parto, sugiriendo que la obesidad durante la gestación puede ser un factor de riesgo para el desarrollo posterior de enfermedad cardiovascular. Sin embargo, los cambios del GC a lo largo de la gestación en animales obesos no han sido analizados hasta el momento. La escasez de estudios longitudinales y la dificultad de llevarlos a cabo en mujeres gestantes ponen en evidencia la necesidad de diseñar nuevos protocolos en animales que permitan evaluar longitudinalmente el impacto de la obesidad sobre las adaptaciones del sistema cardiovascular y la regulación de la PA durante los diferentes trimestres de embarazo.

### **1.6.2 Función renal y obesidad durante el embarazo**

Un gran número de estudios en humanos y modelos experimentales han mostrado que las demandas metabólicas relacionadas con la obesidad producen aumentos importantes de la filtración y el tamaño glomerular, que están asociados con aumentos significativos de la masa renal (Griffin et al., 2008). La hiperfiltración glomerular inducida por la obesidad provoca un incremento en la proteinuria, y posteriormente la aparición de glomeruloesclerosis. Un estudio realizado en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) (Ejerblad et al., 2006) mostró que las personas con sobrepeso e  $IMC \geq 25$   $kg/m^2$  a la edad de 20 años presentaban un riesgo de desarrollar fallo renal crónico tres veces superior que las personas de la misma edad que presentaban un  $IMC < 25$   $kg/m^2$ . Diferentes trabajos de investigación han encontrado también una marcada asociación

entre la obesidad infantil y la enfermedad renal, pero la mayoría de ellos han sido realizados en niños en los estadios finales de la enfermedad o sometidos a trasplante renal (Mitsnefes et al., 2002; Wang et al., 2006). Los estudios que han analizado esta relación en la población en general son escasos y presentan datos contradictorios. Mientras que la mayoría de los autores coinciden en que hay una clara relación entre sobrepeso y obesidad con altos valores de PA desde edades muy tempranas, la presencia de proteinuria en los niños y adolescentes obesos no parece ofrecer resultados tan homogéneos. Estos resultados sugieren que la aparición de proteinuria y glomeruloesclerosis asociadas a la obesidad en edades tempranas parece depender de otros mecanismos que se encuentran desigualmente repartidos entre la población obesa. En este sentido, la gestación podría acelerar el daño renal en mujeres jóvenes en edad fértil con sobrepeso u obesidad, puesto que la etapa gestacional se considera un estado de estrés fisiológico para el organismo que pone a prueba la salud cardiovascular y renal materna.

A pesar de todos estos resultados y que, como se ha citado anteriormente, se ha detectado un notable aumento de la prevalencia de sobrepeso y obesidad en mujeres con edad reproductiva (Otero-Naveiro et al., 2021), no existen estudios que hayan analizado los cambios en la hemodinámica renal materna durante la gestación en mujeres jóvenes con ambos desórdenes. Así mismo, tampoco se han llevado a cabo estudios longitudinales en modelos experimentales animales que permitan determinar el comportamiento de la hemodinámica renal a lo largo de la gestación en respuesta al sobrepeso inducido por una alta ingesta de grasa desde edades tempranas.

### **1.6.3 Flujo sanguíneo uterino y obesidad durante el embarazo**

Varios estudios han demostrado que el sobrepeso y la obesidad puede inducir alteraciones en la estructura y el funcionamiento de la placenta durante el embarazo, las cuales se han asociado con aumentos de diferentes factores inflamatorios, lipotoxicidad, disfunción endotelial y alteraciones en el transporte de nutrientes, en los procesos de angiogénesis y en el remodelado de las arterias espirales (Reichetzeder, 2021). En este sentido, se ha descrito que las mujeres obesas presentan una reducida vascularización fetoplacentaria, que está asociada con menores niveles séricos del factor angiogénico PIGF que los observados en mujeres gestantes de peso normal. También existen

evidencias de que la obesidad está relacionada con una mayor proporción de músculo en la vasculatura uteroplacentaria, sugiriendo que este trastorno metabólico podría provocar isquemia placentaria y, por tanto, contribuir a la CIR y a la PE. Por otra parte, se ha demostrado que la relación peso fetal/peso placenta, considerada como un índice de eficiencia placentaria, disminuye a medida que aumenta el IMC. Esta reducción en la eficiencia de la placenta, entendida como una disminución de la capacidad de la placenta para mantener un adecuado aporte de nutrientes al feto puede ser debida tanto a alteraciones en el peso del feto como en el peso de la placenta. A pesar de ello, la hipertrofia placentaria parece ser la causa más común del reducido índice de eficiencia placentaria característico de las madres con obesidad. En este sentido, el mayor peso de las placentas en las madres obesas se ha asociado a un excesivo crecimiento fetal y a sobrepeso en los neonatos. Sin embargo, hay un porcentaje de mujeres obesas que presentan CIR y dan a luz bebés de bajo peso, alteraciones que parecen estar asociadas a disminuciones en el peso de la placenta y que pueden ser consecuencia de un reducido flujo sanguíneo al lecho uteroplacentario.

Por otra parte, los estudios que han analizado los cambios en el FSU en madres obesas durante la gestación son escasos. Kim et al. (2015) determinaron el IP de la arteria uterina mediante velocimetría Doppler en 229 mujeres al principio del tercer trimestre de gestación. Estos autores encontraron que la incidencia de valores anormales de este índice fue dos veces mayor en mujeres con un  $IMC \geq 25 \text{ kg/m}^2$  previo al embarazo. Así mismo, valores anormales del IP de la arteria uterina se han descrito en el primer y segundo trimestre de embarazo en mujeres obesas.

Estudios experimentales en monos han demostrado que la ingesta crónica de una DAG provoca disminuciones en el flujo sanguíneo en la arteria uterina en el tercer trimestre de gestación, que están asociadas a diversas lesiones histopatológicas en la placenta. La reducción del FSU inducida por la DAG en este estudio fue independiente de la obesidad materna, ya que se observó en todos los animales a pesar de que en un grupo de ellos la dieta no provocó cambios significativos en el peso materno (Frias et al., 2011). Además, la sustitución de la DAG por una dieta normal tres meses antes de la concepción, atenuó las alteraciones en la perfusión placentaria observada en estos animales (Salati et al., 2019). Estos resultados sugieren que un aumento en la ingesta de grasa en el embarazo podría tener un efecto negativo sobre la perfusión placentaria que sería independiente del aumento de peso inducido por este tipo de dieta. En la misma

línea, Wallace et al. (2008), demostraron en un modelo experimental de sobrealimentación en ovejas, que un aumento en la ingesta de nutrientes durante la gestación inducía disminuciones del FSU desde el segundo trimestre de embarazo, que estaban asociadas a una menor masa placentaria y a la CIR. En este modelo experimental, a diferencia de lo que ocurrió en el estudio de Frias et al. (2011), la reducción del FSU en el grupo de animales sobrealimentado estuvo asociada a un mayor incremento de peso materno y un aumento en la adiposidad. Estos resultados sugieren que alteraciones tempranas en el FSU inducidas por una excesiva ganancia de peso en las madres gestantes podrían ser un índice de una inadecuada perfusión placentaria y una causa importante de CIR.

Todos estos resultados, en algunos aspectos contradictorios, ponen en evidencia la necesidad de estudios adicionales que analicen longitudinalmente los efectos de una alta ingesta de grasa sobre las alteraciones del FSU a lo largo de la gestación, y que permitan clarificar los mecanismos subyacentes, además ser el punto de partida para el diagnóstico e identificación temprana de posibles desórdenes gestacionales.

## **1.7 REDUCIDO NÚMERO DE NEFRONAS Y GESTACIÓN**

La presencia de ERC en mujeres gestantes se ha asociado con diversas complicaciones y efectos adversos en el embarazo, entre los que se incluyen la PE, los nacimientos prematuros y el bajo peso al nacer (BPN). La ERC se define como la disminución de la función renal, expresada como una TFG  $< 60$  ml/min/1.73m<sup>2</sup> sin otros signos de enfermedad renal, o como la presencia de daño renal durante más de 3 meses, manifestada en forma directa por alteraciones histológicas en la biopsia renal o en forma indirecta por marcadores de daño renal como albuminuria o proteinuria, alteraciones en el sedimento urinario o alteraciones en pruebas de imagen (Eknoyan, 2007). Con el aumento de la incidencia de esta enfermedad en la población en general, la proporción de mujeres en edad fértil que presentan esta enfermedad es cada vez mayor. El espectro de alteraciones renales observadas en mujeres en edad fértil es muy amplio. Las más frecuentes comprenden anomalías congénitas del riñón y del tracto urinario, nefrosclerosis hipertensiva, nefropatía diabética y diversas glomerulopatías (Eknoyan, 2007).

En las últimas décadas, se ha demostrado que un ambiente perinatal adverso puede programar la aparición de enfermedad renal e HTA en la edad adulta. Según el paradigma de la “programación de la salud y la enfermedad durante el desarrollo” descrito por primera vez por Barker y Osmond (1986), las condiciones adversas durante el desarrollo fetal, la etapa perinatal o en la niñez temprana, pueden afectar la adecuada diferenciación de los distintos órganos y programar la aparición de enfermedades durante la etapa adulta. Numerosos estudios epidemiológicos posteriores han confirmado esta hipótesis mostrando fuertes evidencias de una asociación entre BPN, parto pretérmino, exposición a obesidad o malnutrición materna, exceso de glucocorticoides y PE, con una mayor vulnerabilidad a una amplia variedad de enfermedades en la vida adulta, entre las que se incluyen HTA, enfermedad cardiovascular, diabetes y ERC (de Jong et al., 2012; Gilbert y Nijland, 2008; Mu et al., 2012). La insuficiencia placentaria, un factor común a la mayoría de alteraciones citadas, induce malnutrición e hipoxia fetal, las cuales van a llevar a un anormal crecimiento del feto y a una alteración en el proceso de nefrogénesis (Ojeda et al., 2008). En este sentido, un estudio realizado en 1200 mujeres ha mostrado la existencia de una relación directa entre el aumento de la resistencia placentaria, crecimiento fetal y el volumen del riñón en el tercer trimestre de gestación (Verburg et al., 2007). Varios modelos animales con diferentes grados de alteración en el desarrollo renal, muestran también HTA y daño renal en la edad adulta (Gilbert y Nijland, 2008). Brenner et al. (1988) hipotetizaron que aquellos factores que provocan un BPN, pueden llevar a una reducción programada del número de nefronas, lo cual podría explicar en parte, la demostrada asociación entre una mayor susceptibilidad a HTA y ERC en las poblaciones más desfavorecidas. De acuerdo con esta hipótesis, se ha encontrado que un peso al nacer por debajo de 3 kg está correlacionado con un tamaño reducido del riñón y la aparición de hipertensión sal-sensible (de Boer et al., 2008; Perälä et al., 2011). Además, se ha demostrado que el número de nefronas y la masa renal varían proporcionalmente en niños hasta los tres meses de edad (Zhang et al, 2008), por lo que un reducido volumen renal en la etapa fetal y perinatal podría ser un índice de un reducido número de nefronas en este periodo del desarrollo. Un riñón con menos nefronas (Brenner et al., 1988) tendría alterada la función excretora, de manera que en las nefronas existentes se produciría hiperfiltración e hipertrofia provocando daños estructurales y alteraciones en la función renal, que se agravarían como consecuencia del aumento de la PA, llevando finalmente a una insuficiencia renal. Todos estos resultados indican que un déficit de

nefronas en la etapa fetal y/o perinatal podría ser una causa probable de ERC e HTA en la edad adulta.

Varios estudios epidemiológicos y metaanálisis recientes (Andraweera et al., 2019; Rasmussen y Irgens, 2007; Tsujimoto et al., 2022), aportan evidencias consistentes de que las mujeres con BPN o nacidas prematuras tienen una mayor probabilidad de desarrollar PE e HTA durante la gestación. Sin embargo, los mecanismos que conectan estos desórdenes hipertensivos con el reducido peso al nacer o el nacimiento prematuro de las madres gestantes permanecen sin determinar. A pesar de que los resultados expuestos anteriormente apuntan a que un menor número de nefronas en estas mujeres podría ser el nexo entre un ambiente perinatal adverso y la posterior aparición de complicaciones gestacionales, este aspecto no ha sido estudiado en profundidad. Hasta el momento no existen estudios en mujeres ni en modelos animales experimentales que hayan analizado las adaptaciones cardiovasculares y renales a lo largo de la gestación en madres con reducido número de nefronas desde la etapa perinatal.

Debido a que hay un amplio consenso sobre la relación directa entre el BPN y reducido volumen renal (Mishra et al., 2014), y que como se ha citado anteriormente, el volumen renal al nacer, es una buena forma de estimar el número de nefronas. Los primeros modelos experimentales que fueron desarrollados para el estudio de la programación perinatal de la enfermedad crónica, estudiaron los efectos de la CIR debido a desnutrición sobre la nefrogénesis. Estudios posteriores, en una amplia variedad de modelos experimentales, han demostrado que la salud materna tiene un impacto significativo en el número de nefronas que muestra su descendencia. Así, algunos de los factores que parecen estar envueltos en el anormal desarrollo del riñón fetal son malnutrición materna y obesidad, deficiencia en zinc y vitaminas A y D, ingesta de alcohol y consumo de tabaco, administración de glucocorticoides y drogas inhibidoras de la actividad del SRA y disfunción renal materna (Lumbers et al., 2020). Una característica común en la mayor parte de estos modelos experimentales es que se produce un descenso en la actividad del SRA durante el periodo nefrogénico, y esta parece ser una de las principales causas de la disminución en el número de nefronas (Taylor et al., 2014).

Nuestro grupo de investigación ha desarrollado un modelo experimental con alteraciones del desarrollo renal inducidas por la administración oral de un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> (candesartan, 7 mg/kg/día) durante los primeros 14 días de vida. Hay



que destacar que la nefrogénesis en la rata, a diferencia de lo que ocurre en humanos, no acaba en la etapa final de la gestación, sino que continúa después del nacimiento. Estudios de nuestro grupo utilizando este modelo, han confirmado la importancia de la Ang II en la nefrogénesis, puesto que la administración neonatal del antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> produce cambios irreversibles en la morfología renal (Saez et al., 2007). En este sentido, resultados previos de nuestro grupo han demostrado que las hembras adultas que fueron tratadas con el antagonista en la etapa perinatal presentan reducido número de nefronas, glomeruloesclerosis, HTA y una reserva funcional renal reducida, a pesar de que el peso del riñón y la hemodinámica renal basal son normales (Loria et al., 2007a, 2007b; Saez et al., 2007). Estas alteraciones se agravan con el tiempo, de manera que a los 11 meses estos animales desarrollan HTA sal-sensible y un mayor daño renal, con presencia de proteinuria (Salazar et al., 2008). Sin embargo, se desconoce la respuesta de estos animales a la gestación. En este sentido, es importante destacar que mientras que algunos individuos que están “programados” desde etapas tempranas de la vida desarrollan enfermedades crónicas a pesar de vivir en un ambiente saludable y tener un adecuado estilo de vida, otros solo desarrollan la enfermedad cuando están expuestos a segundas influencias ambientales adversas o lo que se conoce con el término inglés segundo “hit” o segundo “insult”. Estos “hits” pueden ser exógenos, como por ejemplo la exposición a nefrotoxinas o cirugía, o endógenos como la diabetes, obesidad e incluso la gestación (Luyckx y Brenner, 2020). La gestación se considera un test de estrés fisiológico para el sistema cardiovascular materno, puesto que como ya se ha descrito ampliamente en los apartados anteriores, sufre múltiples adaptaciones durante el embarazo en respuesta a las demandas del feto en crecimiento. Las mujeres que no pasan este test de forma adecuada sufren embarazos complicados (Andraweera et al., 2019).

Por tanto, en la presente tesis doctoral se va a analizar si una reducción en el número de nefronas desde la etapa perinatal va a condicionar la adecuada respuesta hemodinámica a la gestación y va a interferir en la regulación de la presión arterial en ratas gestantes. Además, y siguiendo la hipótesis “multiple-hit” se determinará si una alta ingesta en grasa desde una edad temprana puede potenciar los efectos de la gestación sobre este modelo de programación perinatal de la enfermedad renal y cardiovascular. Como ya se ha explicado en el apartado correspondiente a la obesidad, a pesar de los numerosos estudios que han relacionado este desorden con diferentes alteraciones renales, no parece ser suficiente *per se* para provocar la aparición de glomeruloesclerosis

y disminución de los parámetros hemodinámicos renales en la mayoría de los individuos en edades tempranas. En este sentido, es importante considerar que situaciones adversas durante la gestación o la etapa perinatal, que interfieran con el adecuado desarrollo del riñón podrían determinar la aparición de proteinuria y glomerulosclerosis en las personas obesas.

# **OBJETIVOS**



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL:

El objetivo general de la presente tesis doctoral es:

***“Determinar el efecto de una ingesta elevada de grasa desde edad temprana sobre la respuesta hemodinámica a la gestación, y los cambios de la presión arterial, en ratas con déficit de nefronas”.***

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Los objetivos específicos diseñados para la consecución del objetivo principal de la presente tesis se justifican a continuación.

A pesar de que las adaptaciones hemodinámicas a la gestación han sido evaluadas en numerosos estudios, no existe un amplio consenso sobre el grado y la cronología de los cambios en las diferentes etapas gestacionales. La heterogeneidad de los métodos de medida empleados y el carácter invasivo de los mismos, plantean la necesidad de llevar a cabo nuevos estudios usando técnicas no invasivas que permitan evaluar adecuadamente la respuesta hemodinámica integrada a la gestación en el mismo sujeto, facilitando así, el estudio de las alteraciones en esta respuesta que caracterizan a determinadas condiciones patológicas gestacionales. Por lo tanto, ***el primer objetivo específico de esta tesis doctoral es describir los cambios en la hemodinámica cardíaca, renal y uterina, y su relación con la presión arterial a lo largo de la gestación en ratas control, mediante el empleo de técnicas no invasivas.***

El uso de la ultrasonografía Doppler ha sido muy utilizado en los últimos años para valorar la hemodinámica de la circulación uteroplacentaria durante la gestación. El descenso en varios índices calculados a partir de las ondas de velocidad Doppler de la arteria uterina a lo largo de la gestación, se ha interpretado en la mayoría de los estudios

como una consecuencia de la disminución de la resistencia en la vasculatura distal. Sin embargo, los estudios en los que se ha demostrado una asociación entre el remodelado de las arterias espirales y los cambios en los parámetros hemodinámicos obtenidos por ultrasonografía Doppler en las arterias uterinas son escasos. Por tanto, ***el segundo de los objetivos de la presente tesis doctoral es determinar los cambios en los parámetros hemodinámicos en las arterias uteroplacentarias a lo largo de la gestación, en ratas con alteraciones en el remodelado de las arterias espirales y aumentos de la presión arterial inducidos por una disminución de la actividad de la hemo-oxigenasa.***

La obesidad materna es uno de los principales factores de riesgo para la aparición de complicaciones materno-fetales durante el embarazo. Está estrechamente relacionada con numerosas alteraciones que aparecen durante la gestación, entre las que se encuentran la diabetes gestacional, altas tasas de cesárea, nacimientos prematuros y desórdenes hipertensivos como la HTA gestacional y la PE. En este sentido, se ha demostrado que el riesgo de PE o de HTA inducida por el embarazo es significativamente mayor si la madre tiene sobrepeso u obesidad. Además, la incidencia epidemiológica y los datos derivados de modelos animales han demostrado que los niños nacidos de madres con sobrepeso presentan un alto riesgo de desarrollar obesidad y enfermedades cardiovasculares en la edad adulta. A pesar de los numerosos datos epidemiológicos existentes, los estudios que han analizado los cambios de la PA y la respuesta hemodinámica a la gestación en mujeres con sobrepeso u obesidad son escasos. Por ello, ***el tercer objetivo específico de esta tesis doctoral es analizar la influencia de una alta ingesta de grasa desde edad temprana en la respuesta hemodinámica a la gestación y su relación con los cambios de la presión arterial.***

La HTA crónica es otro factor de riesgo importante para la aparición de complicaciones durante el embarazo. En este sentido, el 15-25% de mujeres con HTA crónica desarrollan PE durante el embarazo. A pesar de que los mecanismos implicados en la aparición de HTA crónica son variados y complejos, el papel del riñón en el origen de esta enfermedad es indiscutible. Alteraciones como una reducida masa renal, disminución de la tasa de filtración glomerular y una disminución en la capacidad de excreción de sodio, se han observado frecuentemente en individuos con HTA crónica. Numerosos trabajos de investigación en los últimos años han relacionado la disminución temprana en el número de nefronas con la aparición de disfunción endotelial y con el desarrollo de alteraciones renales e HTA en la edad adulta. Sin embargo, hasta el

momento no se ha determinado si las mujeres con déficit de nefronas desde el nacimiento presentan una respuesta hemodinámica inadecuada a la gestación o tienen un mayor riesgo de sufrir complicaciones gestacionales. Por este motivo, ***el cuarto objetivo específico del presente trabajo de tesis doctoral es evaluar la respuesta hemodinámica a la gestación y la evolución de la presión arterial en ratas con déficit de nefronas desde la etapa perinatal.***

Se ha demostrado que un riñón con menor número de nefronas desde la etapa perinatal tiene una menor capacidad para responder a situaciones que exigen el reclutamiento de la reserva funcional renal, de manera que un segundo o tercer “hit” puede acelerar el daño renal en individuos con déficit de nefronas y, por tanto, provocar una clara manifestación de la enfermedad. En este sentido, la obesidad en estos individuos es un factor de riesgo importante para el desarrollo de grados más severos de la enfermedad. Por otra parte, la gestación se considera un test de estrés fisiológico para el sistema cardiovascular materno, puesto que este sufre importantes adaptaciones durante el embarazo. Sin embargo, los efectos de la obesidad o el sobrepeso en la respuesta hemodinámica a la gestación mujeres con enfermedad renal programada no se conocen. Así, ***el último de los objetivos específicos de la presente tesis doctoral es determinar si la ingesta elevada de grasa desde una edad temprana, supone un factor de riesgo añadido para el desarrollo de alteraciones en la respuesta hemodinámica a la gestación y en la presión arterial en ratas con déficit de nefronas.***





# **MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos fueron realizados en ratas Sprague-Dawley (SD) suministradas por el Servicio de Animales de Laboratorio de la Universidad de Murcia. El estudio fue previamente aprobado por el comité de ética de nuestra Universidad (A1320140709) y los experimentos se llevaron a cabo de acuerdo a la Directiva 2010/63/EU de protección de animales usados para fines científicos. Las ratas fueron alojadas en jaulas de plástico (45x34x20 cm) y acomodadas con un lecho de viruta de madera, dentro de una habitación con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, con temperatura ( $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad relativa (45-60%) controladas y con acceso *ad libitum* a comida y agua.

La metodología utilizada y los protocolos experimentales diseñados para cumplir cada uno de los objetivos se explican a continuación. Dada la similitud en el diseño de los protocolos experimentales para llevar a cabo los objetivos 1, 3, 4 y 5 se describirán conjuntamente, mientras que los correspondientes al objetivo 2 se detallarán posteriormente.

#### 3.1 DISEÑO Y GRUPOS EXPERIMENTALES (objetivos 1, 3, 4 y 5)

Los grupos de animales estudiados para cumplir los objetivos 1, 3, 4 y 5 se obtuvieron del cruce de ratas hembras SD de 12-14 semanas de edad con machos SD en edad fértil. Se consideró como día 1 de gestación (E1) la mañana en la que se encontró por primera vez esperma en el frotis vaginal de las hembras. Tras el parto, después de un periodo gestacional de entre 21-23 días (E21), las camadas obtenidas a partir de cada rata fueron estandarizadas (10 crías/rata). Las camadas con menos de 10 o más de 16 animales fueron excluidas.

En el momento del destete, a los 22 días de edad, las hembras procedentes de las diferentes camadas fueron separadas y distribuidas en grupos de dos animales por jaula. Para la formación de los grupos experimentales se empleó un software online de randomización ([www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)), obteniendo así, los siguientes grupos:

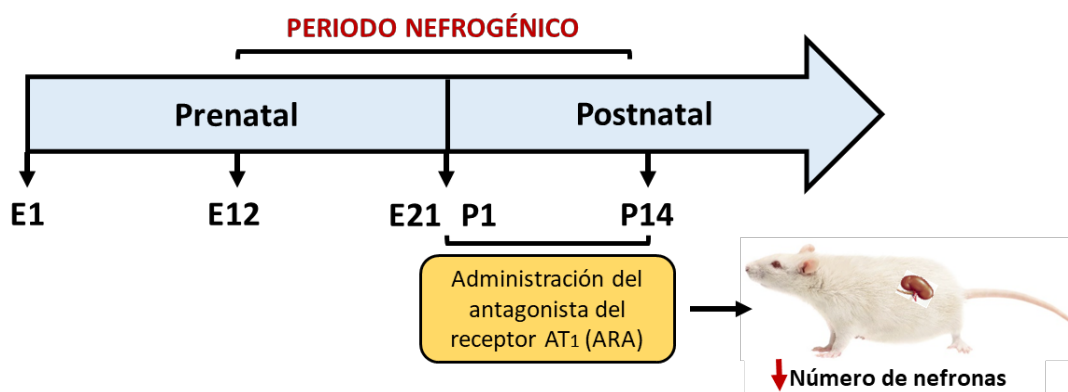
- **Grupo 1: ratas gestantes control** (n=10): ratas alimentadas con dieta con un contenido normal de grasa (DNG) desde el destete y durante toda la gestación.
- **Grupo 2: ratas gestantes alimentadas con una dieta alta en grasa (DAG)** (n=10): ratas alimentadas con una DAG desde el destete y durante toda la gestación.
- **Grupo 3: ratas gestantes con reducido número de nefronas (ARA)** (n=7): ratas alimentadas con DNG desde el destete y durante toda la gestación, y con alteración de la nefrogénesis inducida por la administración de un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> (ARA II) los primeros 14 días postnatales.
- **Grupo 4: ratas gestantes con reducido número de nefronas y alimentadas con una dieta alta en grasa (ARA-DAG)** (n=10): ratas alimentadas con DAG desde el destete y durante toda la gestación, y con alteración de la nefrogénesis inducida por la administración de un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> (ARA II) los primeros 14 días postnatales.

A las 12 semanas de edad, las ratas hembras se colocaron en una jaula con un macho fértil, considerándose como E1 la mañana en la que se encontró espermatozoides en el frotis vaginal. Las ratas gestantes del mismo grupo experimental, se distribuyeron por parejas en diferentes jaulas, y cuatro días antes del parto (17 días de gestación), se separaron en jaulas individuales. Los cambios en la PAS, GC, FSR y TFG fueron evaluados antes de la concepción y en los días 7, 14 y 19 de gestación en todos los grupos de animales. La hemodinámica de la arteria uterina y de las arterias radiales se examinó en los días 7, 14 y 19 de gestación debido a que los sacos amnióticos en la rata únicamente se visualizan con claridad a partir del día 7 de gestación. Para la valoración de la función cardíaca, la medida del FSR y el análisis de la hemodinámica uterina, se empleó un equipo preclínico de ultrasonidos de alta resolución (Vevo® 3100, VisualSonics, Toronto, Canadá). Las medidas de PAS se realizaron mediante un pletismógrafo computarizado (CODA, Kent Scientific Corporation, CT). El valor final de este parámetro fue el resultado del promedio de 10 mediciones consecutivas. Transcurridas cinco horas de haber finalizado la evaluación ecográfica y de la PAS, se determinó la TFG mediante la cinética de

eliminación de un análogo de inulina marcado con fluorescencia. Después del parto, las ratas fueron mantenidas con todas sus crías hasta finalizar el experimento.

### 3.1.1 Modelo experimental de reducido número de nefronas

La disminución en el número de nefronas en las ratas hembra se indujo mediante la administración oral de un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> (ARA II) (candesartan, 7 mg/kg/día) durante los primeros 14 días de vida (*figura 1*) como ha sido descrito en estudios previos de nuestro grupo (Loria et al., 2007a, 2007b; Saez et al., 2007). En estos estudios se ha demostrado que las hembras adultas que fueron tratadas con el ARA II en la etapa perinatal presentan reducido número de nefronas, glomeruloesclerosis, HTA y una reserva funcional renal reducida, a pesar de que el peso del riñón y la hemodinámica renal basal son normales. Estas alteraciones se agravan con el tiempo, de manera que a los 11 meses estos animales desarrollan HTA sal-sensible y un mayor daño renal, con presencia de proteinuria (Salazar et al., 2008).

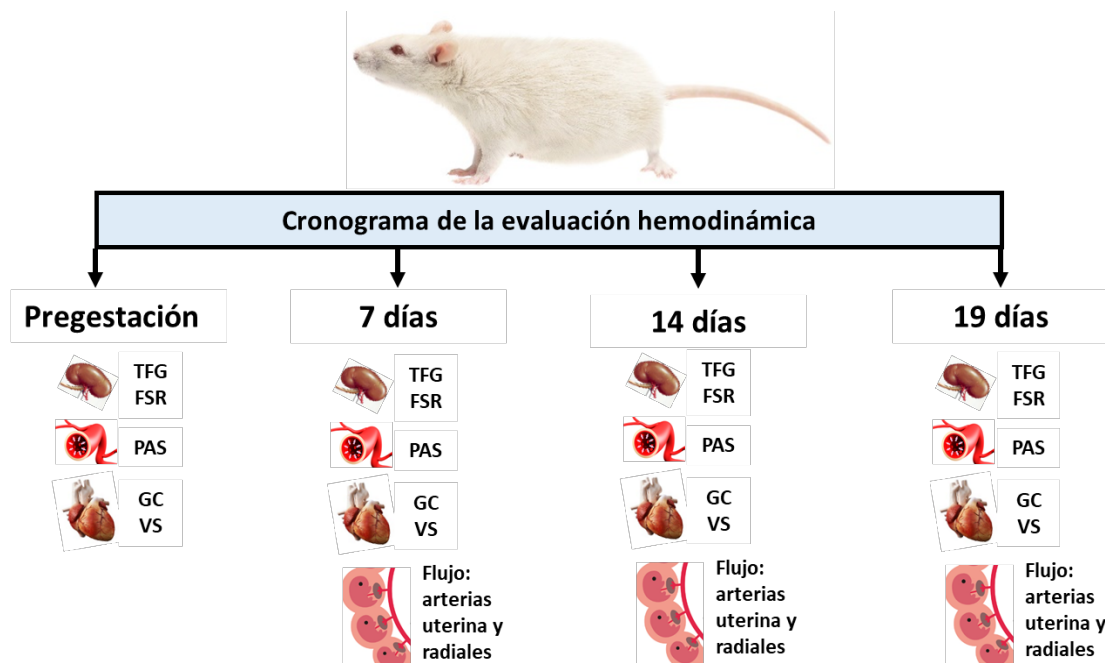


**Figura 1:** diagrama representativo del periodo nefrogénico de la rata y el protocolo realizado para la obtención de los grupos experimentales con reducido número de nefronas mediante la administración de un ARA. E1: día embrionario 1; E12: día embrionario 12, E21: día embrionario 21, P1: día postnatal 1, P14: día postnatal 14.

### 3.1.2 Dietas utilizadas

- **Dieta con contenido normal en grasa (DNG)** (Tekland 2014, densidad energética: 2,9 Kcal/g): las calorías de la dieta proceden de las proteínas (20%), de la grasa (aceite de soja) (13%) y de los carbohidratos (67%).
- **Dieta alta en grasa (DAG)** (Tekland TD.06414, densidad energética: 5,1 kcal/g): las calorías de la dieta proceden de las proteínas (18,4%), de la grasa (manteca de cerdo + aceite de soja) (60,3%) y de los carbohidratos (21,3%).

## 3.2 PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

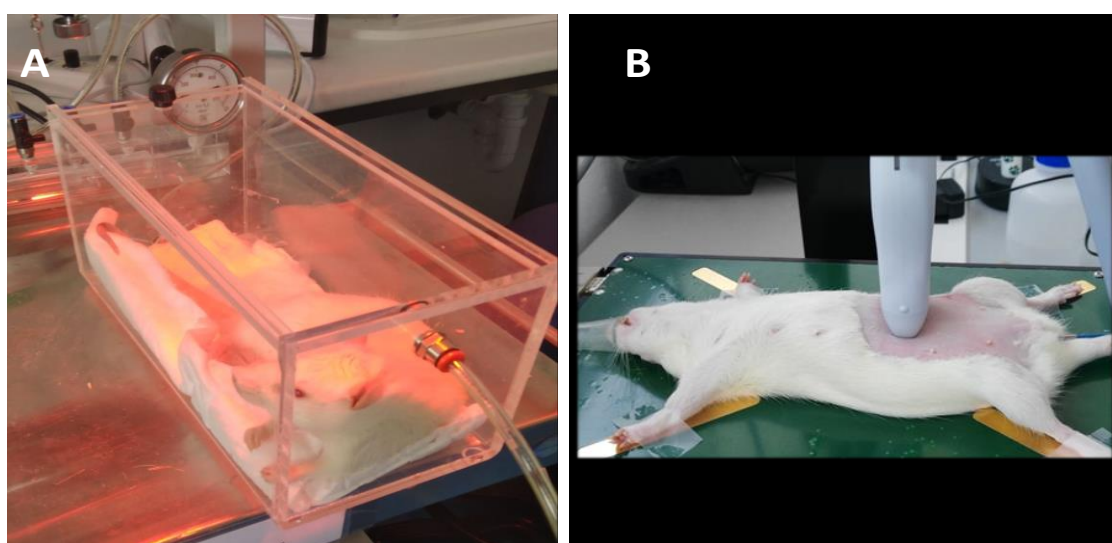


**Figura 2:** representación esquemática de la determinación de los distintos parámetros hemodinámicos llevados a cabo en la ratona antes y a lo largo de la gestación.

### 3.2.1 Estudio ecográfico

#### 3.2.1.1 Preparación para la imagen

Los estudios ecográficos se realizaron bajo anestesia inhalatoria (isoflourano con O<sub>2</sub> administrado mediante mascarilla: 4% para inducir y 2-2.5% para el mantenimiento) (*figura 3A*) y fueron realizados por un mismo operador (LO), en un periodo de tiempo que no sobrepasó los 30 minutos en cada una de las determinaciones. Los animales anestesiados se colocaron en posición supina sobre una plataforma calefactora para mantener su temperatura corporal durante todo el procedimiento. Las cuatro extremidades se pusieron en contacto con diferentes electrodos para monitorizar la FC, la frecuencia respiratoria (FR) y el electrocardiograma (ECG). La temperatura corporal se controló mediante un sensor de temperatura rectal integrado (36.5-37.5°C) (*figura 3B*). Además, se les aplicó un colirio en ambos ojos con el fin de prevenir la desecación e irritación provocada por la anestesia. La región torácica, abdominal y pélvica de la parte ventral del animal se depiló con una rasuradora eléctrica y mediante la aplicación de una crema depilatoria. Como medio de contacto se utilizó un gel de ecografía atemperado, que se aplicó sobre la piel del animal para facilitar la penetración de los ultrasonidos.




**Figura 3:** caja de inducción anestésica (A); animal posicionado sobre la plataforma térmica y mantenido bajo anestesia inhalatoria mediante mascarilla. Las cuatro extremidades permanecen en contacto con los electrodos y una sonda rectal monitoriza la temperatura corporal (B).

### 3.2.1.2 Equipo de ultrasonografía y obtención de las ondas de velocidades Doppler

El estudio ecográfico se llevó a cabo empleando un sistema de ultrasonidos preclínico de alta resolución (Vevo® 3100, VisualSonics, Toronto, Canadá) (*figura 4*) equipado con dos transductores lineales *array* (MX Series) (*figura 5*).



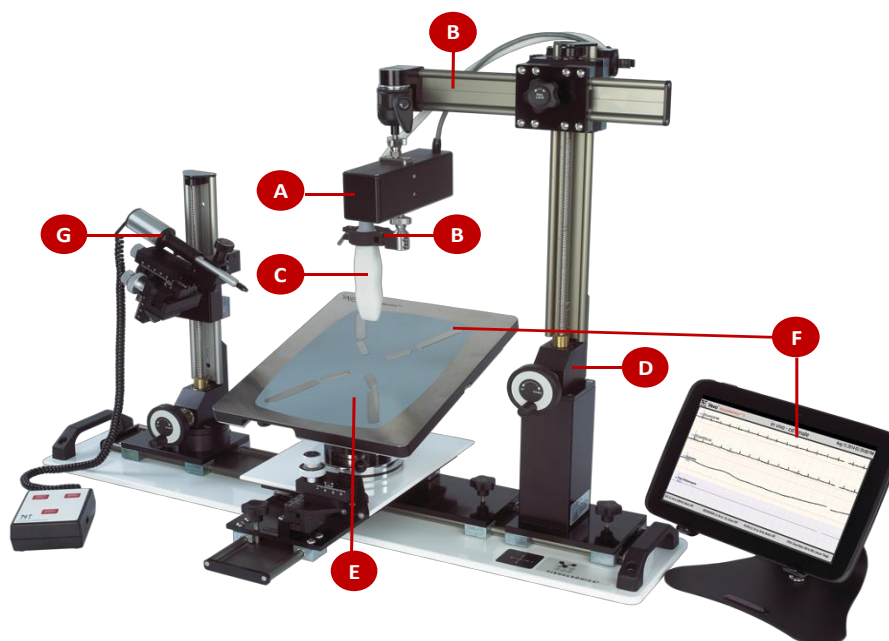
**Figura 4:** equipo de ultrasonidos preclínico de alta frecuencia Vevo® 3100 y una de las sondas lineales *array* ampliada.

Transductor	Frecuencia central (MHz)	Ancho de banda (MHz)	Resolución espacial ( $\mu\text{m}$ )	Campo de visión Máx. (mm)	Profundidad focal (mm)
 <b>MX250</b>	20	13-30	Lateral: 165 Axial: 75	Ancho: 23 Profundidad: 36	15
 <b>MX400</b>	30	22-55	Lateral: 110 Axial: 50	Ancho: 15,4 Profundidad: 20	9

**Figura 5:** transductores lineales *array* MX250 y MX400 y sus principales características.



El transductor seleccionado se acopló al “*system rail*” (Vevo® Integrated Rail System) integrado por un conjunto de elementos que permiten manipular y posicionar tanto el transductor como la camilla calefactora donde se encuentra posicionado el animal hasta conseguir la imagen deseada (*figura 6*).



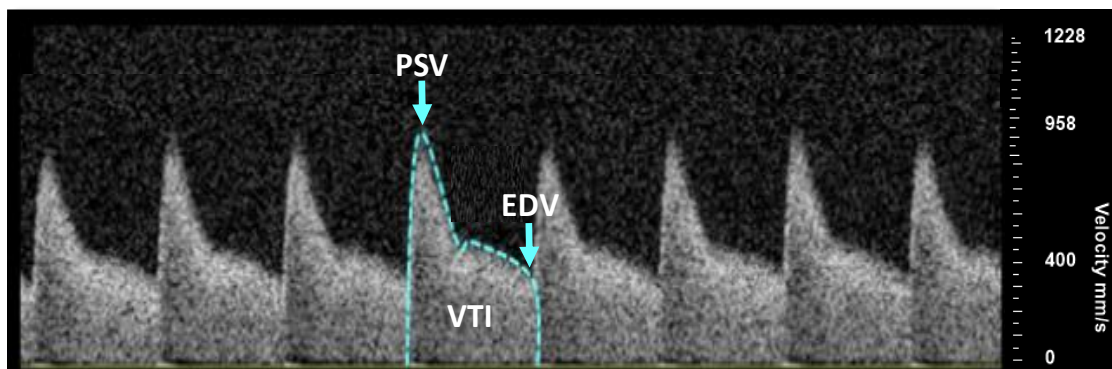
**Figura 6:** *Integrated Rail System* y sus diferentes elementos: motor para obtener medidas volumétricas mediante el modo 3D (A); soporte de acoplamiento de la sonda ecográfica (B); transductor (C); base de la plataforma donde se integran los diferentes elementos (D); camilla térmica (E) con cuatro electrodos y sistema de monitorización de las constantes fisiológicas del animal (F); sistema de microinyección (G).

Una vez estabilizadas las constantes vitales del animal, se procedió a la realización del estudio ecográfico. El transductor seleccionado (MX250 o MX400) se acopló en el *system rail* y a continuación se activó el modo-B para localizar y visualizar los órganos de interés. La profundidad de la imagen fue ajustada entre 3 y 10 mm y se obtuvieron entre 20-30 fotogramas/s en cada una de las adquisiciones. Una vez localizado el vaso, se activó el Doppler color para detectar la dirección y la velocidad del flujo sanguíneo dentro del mismo. La frecuencia de repetición de pulso o “*pulse repetition frequency*” (PRF) fue fijada entre 4 y 48 kHz para detectar las velocidades de flujo desde las más bajas a las más altas, respectivamente. La pared de filtro se ajustó entre 100 y 250 Hz. A continuación, se seleccionó el Doppler pulsado y el volumen de muestra se colocó en el

centro del vaso y de forma paralela, ajustándolo entre 0.2 y 0.5 mm. El transductor y el cursor del ángulo se fueron moviendo y orientando hasta conseguir que el ángulo de insonación estuviera en un rango entre 30°-60°. A partir del volumen de muestra seleccionado de la luz del vaso, se obtuvo el espectro de ondas de velocidades Doppler.

### ***3.2.1.3 Análisis de la onda de velocidades Doppler***

- Velocidad sistólica máxima o “*peak systolic velocity (PSV)*”: el punto más alto de la onda sistólica fue considerado como el pico de velocidad sistólica. Es el punto donde la frecuencia Doppler es máxima. Fue medida en 5 ciclos cardíacos consecutivos.
  
- Velocidad diastólica final o “*end-diastolic velocity (EDV)*”: el punto más bajo antes del siguiente pico sistólico fue considerado como la velocidad al final de la diástole. Fue medida en 5 ciclos cardíacos consecutivos.
  
- Velocidad media o “*time-average maximum velocities (VM)*”: es el promedio de los valores máximos (velocidad sistólica y velocidad diastólica) a lo largo del tiempo de un ciclo cardíaco. Fue determinada por el equipo de ultrasonidos automáticamente considerado cinco ciclos cardíacos consecutivos.
  
- Integral de la velocidad en el tiempo o “*velocity time integral (VTI)*”: es la integral bajo la curva calculada durante un ciclo cardíaco. Fue determinada por el equipo de ultrasonidos automáticamente considerado cinco ciclos cardíacos consecutivos.



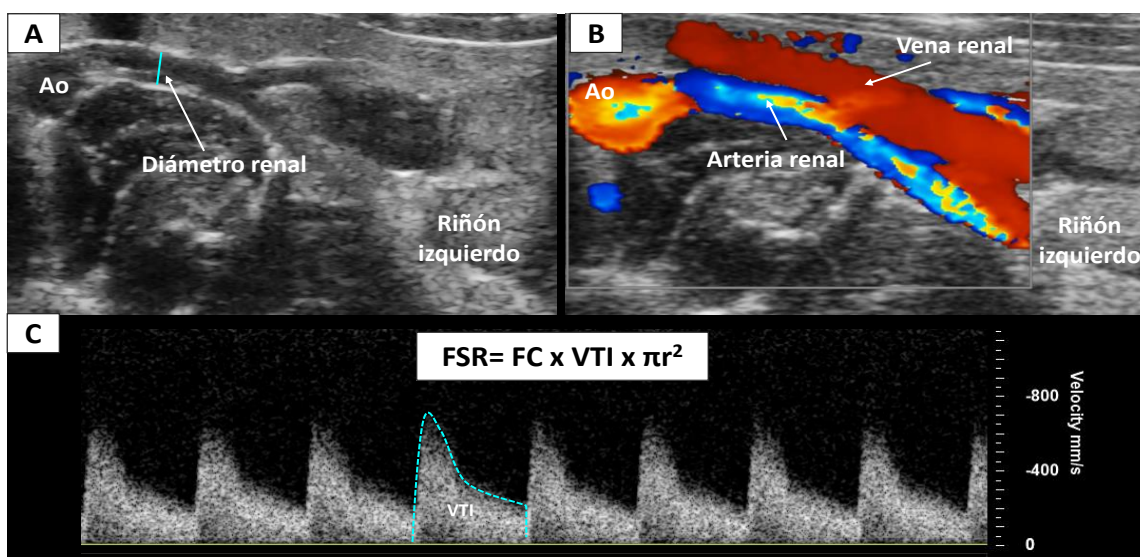
**Figura 7:** espectro de la velocidad de flujo sanguíneo respecto al tiempo, en la que se señala la PSV, EDV y la VTI.

A pesar de que la forma habitual de valorar el flujo sanguíneo uterino a partir del espectro de ondas de velocidades Doppler en mujeres gestantes ha sido hasta el momento la determinación de los índices de pulsatilidad ( $IP=PSV-EDV/VM$ ), resistencia ( $IR=PSV-EDV/PSV$ ) y de la relación  $PSV/EDV$  (S/D), su uso como prueba diagnóstica para predecir complicaciones gestacionales está siendo controvertido en los últimos años, pues tienen un amplio margen de variación, sensibilidad y especificidad (Flo et al., 2011). Aunque estos índices son independientes del ángulo de insonación, no tienen unidades de medida y presentan una relación directa con la diferencia de velocidades de acuerdo con la morfología de la onda de velocidad de flujo, sea en condiciones de flujo sanguíneo alto, medio o bajo. Sin embargo, las velocidades de flujo calculadas a partir del espectro de ondas de velocidades Doppler de la arteria (PSV, EDV, VM y la VTI) tienen unidades y presentan relación directa con el volumen de sangre que pasa por dicha arteria (Apaza Valencia y Delgado Rendón, 2015), por lo que cada vez son más numerosos los trabajos de investigación en los que se utilizan las velocidades de flujo para evaluar la perfusión uteroplacentaria. Por todo ello, en el presente trabajo de tesis doctoral se han utilizado las velocidades de flujo en lugar de los citados índices para analizar la hemodinámica de la unidad uteroplacentaria en las diferentes situaciones experimentales.



### 3.2.1.5 Evaluación del FSR

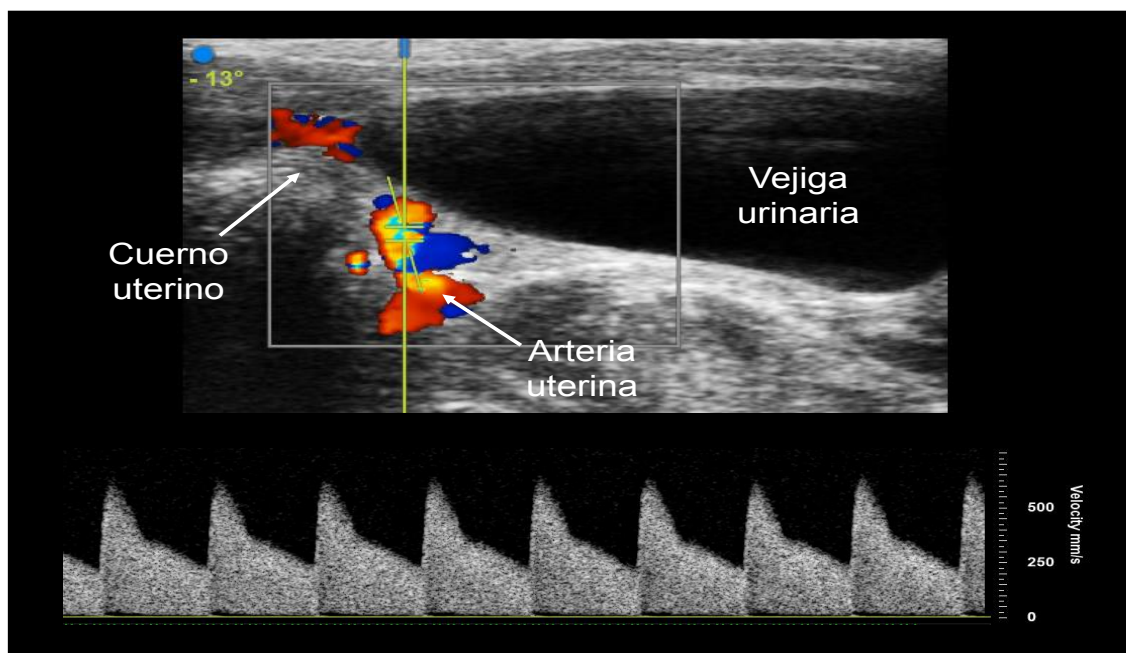
El FSR fue obtenido del riñón izquierdo debido a que su arteria renal se encuentra más superficial y tiene mejor acceso ecográfico que la arteria renal derecha. Empleando el *Integrated Rail System*, el transductor MX400 fue posicionado en un plano de sección transversal, 1-2 cm debajo del tórax en la zona izquierda abdominal del animal. La sonda fue posicionada creando un ángulo de 90° con la línea paraesternal izquierda a nivel de arteria renal izquierda. A continuación, se activó el modo-B para visualizar la arteria renal y se midió su diámetro trazando una línea entre los dos lados opuestos de la capa interna de la pared de la arteria (**figura 9A**). Se realizaron cinco medidas y se hizo una media de todas ellas para obtener un valor total del diámetro arterial. Al activar el modo Doppler color, se visualizaron la arteria y la vena renal mediante una codificación de colores relacionados con la dirección y velocidad de flujo sanguíneo (**figura 9B**). Se seleccionó el Doppler pulsado y se colocó el cursor del ángulo Doppler en el centro de la luz del vaso, que se fue rotando hasta conseguir posicionarlo paralelo al vaso y con una angulación inferior a 60°. A partir del tamaño de muestra seleccionado se obtuvo el espectro de velocidades de flujo, y el FSR se calculó mediante la siguiente ecuación:  $FSR = FC \times VTI \times \pi r^2$ , donde r es el radio del vaso (**figura 9C**).



**Figura 9:** visualización en modo-B del diámetro de la arteria renal izquierda (A); arteria y vena renal emergiendo de la aorta abdominal (Ao) en una imagen en Doppler color (B); espectro de velocidades de flujo donde se ha calculado el VTI (C). En la parte superior aparece la fórmula para obtener el FSR.

### 3.2.1.6 Evaluación de la hemodinámica de las arterias uterinas y radiales

Las ondas de velocidad Doppler de la arteria uterina fueron obtenidas cerca de la unión uterocervical, próxima a la arteria ilíaca y detrás de la vejiga urinaria. Para localizarla, el transductor MX400 se posicionó un centímetro por encima del orificio vaginal, orientado diagonalmente, quedando la muesca del transductor en la zona derecha del animal. Para conseguir una imagen nítida se utilizó el *Integrated Rail System*. Una vez posicionado el transductor, se activó el modo-B y se obtuvo una imagen de la vejiga urinaria junto con los cuernos uterinos. Posteriormente se seleccionó el Doppler color y se visualizó la arteria uterina (*figura 10*).

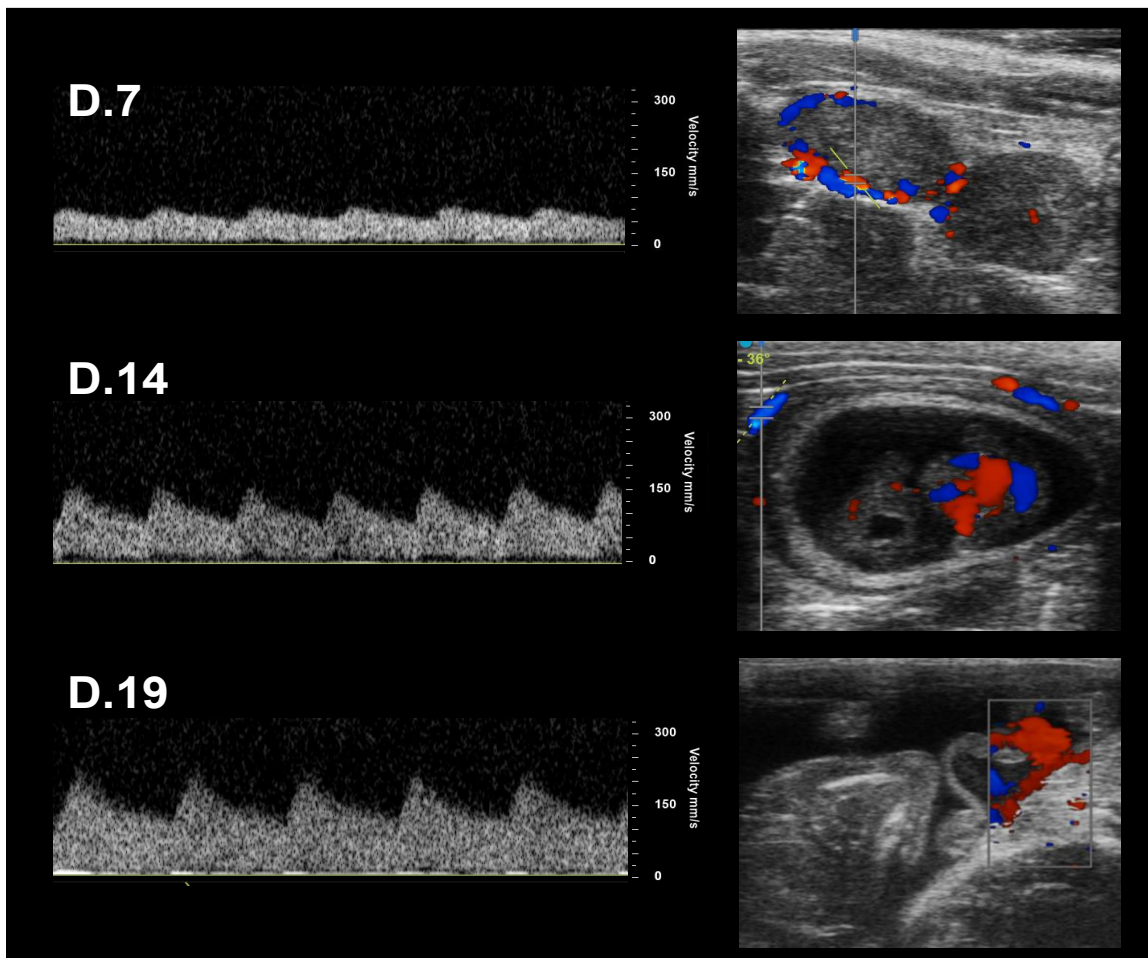


**Figura 10:** imagen Doppler de la arteria uterina y su espectro de velocidades de flujo.

También se obtuvieron las ondas Doppler de las arterias radiales, ya que aportan información esencial acerca de la irrigación embrionaria. La evaluación ecográfica fue llevada a cabo en cuatro embriones, dos de cada cuerno uterino. La sonda MX400 se empleó durante la primera y segunda semana de gestación, y la MX250 en el día 19 de



gestación. El transductor se posicionó en un plano transversal o longitudinal bajo el tórax y se fue desplazando para localizar los fetos usando el modo-B. Después, se activó el modo Doppler color y las arterias radiales se pudieron visualizar alrededor de los embriones (*figura 11*).



**Figura 11:** arterias radiales rodeando a los embriones de rata en distintas etapas de gestación (7,14 y 19 días, respectivamente) y sus espectros de velocidades de flujo.

### 3.2.1.7 *Análisis de imagen*

Todas las imágenes fueron transferidas a una memoria externa y posteriormente analizadas en una estación de trabajo mediante el paquete de software de análisis Vevo LAB V.3.0.0 (VisualSonics).

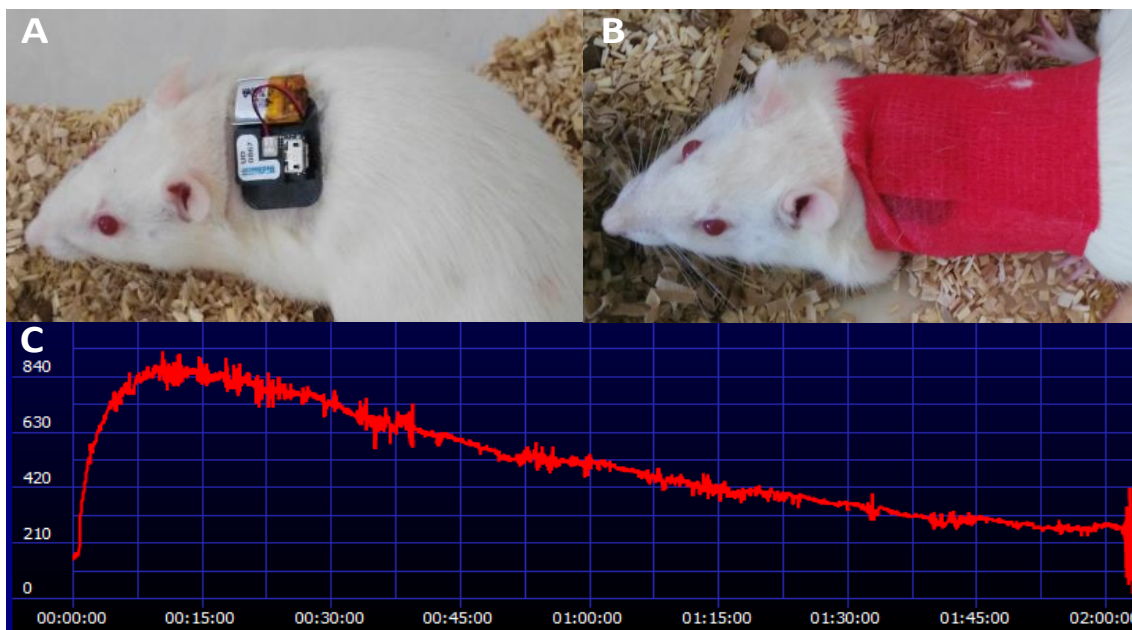
### 3.2.2 Medida de la TFG en ratas conscientes

Las determinaciones de la TFG se realizaron utilizando una técnica desarrollada recientemente, que permite medir este parámetro de forma no invasiva en el animal consciente mediante un dispositivo transcutáneo que cuantifica el aclaramiento de un marcador exógeno de la filtración glomerular marcado con fluoresceína. Este marcador exógeno, la sinestrina, es un análogo de la inulina y está marcado con isotiocianato de fluoresceína (fluorescein-isothiocyanate-labelled [FITC] sinistrin). El dispositivo que se coloca al animal es de pequeño tamaño (NIC-Kidney, Manheim Pharma & Diagnostic, Germany) y está compuesto por una batería y 2 diodos, uno que emite luz de longitud de onda 480 nm y otro diodo que detecta la luz emitida por el fluorocromo marcador a 520 nm a través de la piel (*figura 12A*).

Para la colocación de dicho dispositivo, las ratas fueron ligeramente anestesiadas mediante isoflurano (2-2.5%) y se les rasuró una pequeña zona del dorso con una rasuradora eléctrica y crema depilatoria. El dispositivo se colocó en la zona desprovista de pelo, asegurando un adecuado contacto con la piel y se fijó mediante una cinta adhesiva (*figura 12B*). Seguidamente, se inyectó a los animales una solución de FITC- sinistrin (40 mg/ml) a través de la vena de la cola (5 mg/100 g peso corporal) y se les dejó despertar de la anestesia en jaulas individuales, en las cuales permanecieron durante el tiempo de la medición. Una vez finalizado el periodo de medida (120 min), el dispositivo se retiró de la piel del animal y se conectó a un ordenador mediante un cable USB para descargar los datos recogidos. El software de análisis calculó la vida media de FITC-sinistrin ( $t_{1/2}$ ) junto con un valor  $R^2$  determinado por un modelo de compartimento 1 (*figura 12C*). La vida media de FITC-sinistrin permite calcular la TFG utilizando un factor de conversión ( $31.26 / t_{1/2}$ ). Esta metodología es muy sensible y presenta múltiples ventajas en comparación con los métodos convencionales de medición de TFG, como es el caso del aclaramiento de la inulina. La capacidad de medir el aclaramiento de sinestrina a través de la piel permite evaluar la función renal sin necesidad de implantar un catéter para la toma de muestras sanguíneas repetidas. Esto podría conducir a hipovolemia en animales de tan pequeño tamaño, con consecuentes cambios en la actividad nerviosa simpática y en la Ang II, que podrían reducir la TFG. Además, los métodos de aclaramiento generalmente requieren la restricción del movimiento de los animales para la recolección de muestras, causándoles así, un gran estrés, que no es nada adecuado en un estado



gestacional. Su carácter no invasivo hace posible realizar varias mediciones a lo largo del tiempo y en un mismo animal.

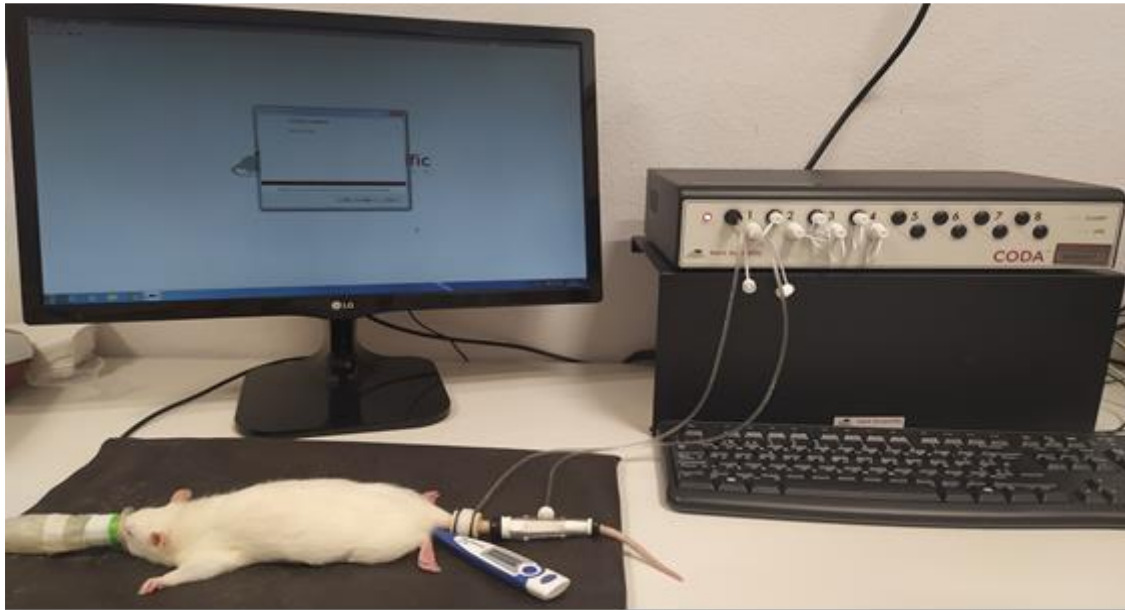


**Figura 12:** colocación (A) y fijación (B) del dispositivo de medición de la TFG al cuerpo del animal; curva de la cinética de eliminación de la FITC-sinistrin (C).

### 3.2.3 Medición de la presión arterial en ratas anestesiadas

La PAS fue determinada a través de un pletismógrafo computarizado (CODA, Kent Scientific Corporation, CT) (*figura 13*). Se trata de un método no invasivo de medición de PA constituido por un manguito de oclusión que se infla y desinfla alrededor de la arteria de la cola del animal. Mediante un sensor de registro de presión-volumen colocado alrededor de la cola y un transductor de presión sanguínea se pueden obtener los cambios de presión sistólica y diastólica que ocurren en la vena de la cola del animal. Para obtener medidas fiables, las mediciones se realizaron en una habitación tranquila, libre de ruidos y aclimatada a una temperatura de 25-30°C. Además, el animal fue ligeramente anestesiado mediante isoflourano (2-2.5%) para minimizar el estrés provocado por el inflado y el desinflado del manguito en cada uno de los ciclos. A continuación, se colocó en una plataforma calefactora a 32-34°C con el fin de mantener la temperatura corporal (36.5-37.0°C) durante todo el procedimiento y promover la

vasodilatación y la detección del flujo sanguíneo a través de la cola del animal. Después de 5-7 minutos de aclimatación y estabilización del animal, se colocaron los dos manguitos de oclusión en la base de la cola, dejando una separación de 1-2 mm entre ellos. Se configuró el software con los parámetros deseados y comenzaron las mediciones. Se realizaron 10 determinaciones consecutivas y el valor final de PAS fue el resultado del promedio de todas ellas.



**Figura 13:** determinación de la PA en rata mediante pletoisografía computarizada

### **3.3 DISEÑO Y GRUPOS EXPERIMENTALES (objetivos 2)**

#### **3.3.1 Grupos experimentales**

Para cumplir el objetivo 2 de la presente tesis doctoral, se compararon en primer lugar, los efectos de un inhibidor de la HO, mesoporfirina de estaño (SnMP), sobre la PAM en ratas vírgenes y gestantes. SnMP (Frontier Scientific) se administró por vía intraperitoneal a una dosis de 50  $\mu\text{mol/kg}$  el día 14 de gestación. La dosis empleada fue similar a la que utilizaron en el estudio de George et al. (2013), ya que estos autores

mostraron que la SnMP reduce significativamente la actividad de HO en el hígado y en la placenta de ratas preñadas 5 días después de su administración. Los animales se dividieron en 4 grupos experimentales: ratas vírgenes tratadas con vehículo (50 mmol Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) (n = 10) o SnMP (n = 10) y ratas preñadas tratadas con vehículo (n = 10) o SnMP (n = 10). La PAM se midió en todos los animales conscientes el día 19 de gestación a través de un catéter implantado en la arteria carótida. Al final del experimento, las ratas fueron sacrificadas y se obtuvo el tracto reproductivo de cada una de ellas. Se contabilizaron el número de embriones sanos y los sitios de reabsorción, y a continuación se tomaron muestras de tejidos placentarios para medir la actividad de HO. También se extrajeron los sitios de implantación incluyendo la placenta y el triángulo mesometrial para cuantificar la remodelación del trofoblasto mediante inmunohistoquímica. Todas las secciones teñidas se escanearon con un escáner microscópico de portaobjetos y se visualizaron con un software digital. En el triángulo mesometrial se contabilizaron el número total de secciones de arterias espirales invadidas y no invadidas. Posteriormente, mediante un programa de imagen se evaluó la invasión del trofoblasto y la remodelación de las arterias espirales.

En segundo lugar, la expresión de HO-1 y HO-2 se determinó en 3 grupos de animales: grupo de ratas de 8 (n = 6), 14 (n = 5) y 19 (n = 4) días de gestación. Todos los animales fueron sacrificados y se extrajeron los sitios de implantación. Las muestras obtenidas fueron sometidas a electroforesis y posteriormente a una evaluación mediante quimioluminiscencia.

Finalmente, otros dos grupos de animales: ratas gestantes tratadas con vehículo (n=7) y ratas gestantes tratadas con SnMp (n=7) fueron analizados para determinar el efecto de la inhibición de la HO sobre la hemodinámica uteroplacentaria. Las velocidades de flujo sanguíneo de las arterias uterinas y radiales se obtuvieron de las ratas gestantes en los días 14 y 19 de gestación, antes y después del tratamiento con vehículo o SnMP (n = 7) mediante el equipo de ultrasonidos de alta resolución (Vevo® 3100, VisualSonics, Toronto, Canadá).

### **3.3.2 Protocolos experimentales**

#### **3.3.2.1 Expresión de HO-1 y HO-2**

La expresión de las dos isoformas de la HO, HO-1 y HO-2 se analizó en tejido procedente del triángulo mesometrial de las ratas gestantes. Las muestras de tejido se homogeneizaron en tampón Tris-HCl, concentrado a 50-mmol/L y mantenido a baja temperatura, pH 7.4, que contenía 1% de NP-40, desoxicolato sódico al 0,25%, EDTA 1-mmol/L y un cóctel de inhibidor de proteasa al 10% (Sigma -Aldrich). La mezcla homogenizada resultante (50 µg), se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12% y luego se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno. Las membranas se incubaron durante 1 h con una dilución 1:1000 de anticuerpos de conejo anti-rata de HO-1 monoclonal o HO-2 policlonal (Stressgen Biotechnologies). La detección de quimioluminiscencia se realizó con el kit de detección Amersham ECL de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los cambios en la expresión de las proteínas se cuantificaron mediante análisis de densitometría y se presentaron como el ratio de proteínas HO/ $\beta$ -actina en muestras corridas en el mismo gel.

#### **3.3.2.2 Medida de la presión arterial en ratas conscientes crónicamente instrumentadas**

En el día 17 de gestación, las ratas fueron anestesiadas y sometidas a cirugía para colocarles un catéter permanente en la arteria carótida (tubo V / 3, LME). Este catéter fue canalizado a través de la piel y se exteriorizó por la parte posterior del cuello. En el día 19 de gestación, las ratas conscientes se colocaron en jaulas de restricción individuales y el catéter carotideo se conectó a un transductor de presión. Después de un período de estabilización de 1 h, se monitorizó la PAM durante 40 minutos usando un sistema de adquisición de datos (Sistema PowerLab).

### **3.3.2.3 Medición de la actividad HO**

Para demostrar el efecto inhibitor de la SnMP, se comparó la actividad de la HO en los sitios de implantación (placenta junto con el triángulo mesometrial) de ratas preñadas control y tratadas con el inhibidor de la HO. La actividad de la HO se midió motorizando la conversión de bilirrubina frente al tejido lisado expuesto. El tejido homogenizado obtenido de los sitios de implantación en el día 19 de gestación, se combinó con 2 mM de glucosa-6-fosfato, 0.2 U de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, 0.8 mM de nicotinamida-adenina dinucleótido fosfato y 20.0  $\mu$ M de hemina, en un volumen de reacción total de 1200  $\mu$ l. Después de 1 hora de incubación a 37 °C, se extrajo la bilirrubina con cloroformo y se determinó su concentración espectrofotométricamente usando la diferencia de absorbancia a longitudes de onda desde  $\lambda$ 460 a  $\lambda$ 530 nm con un coeficiente de absorción de 40 mM/cm. La actividad se expresó en nanogramos de bilirrubina por microgramo de proteína por hora.

### **3.3.2.4 Inmunohistoquímica**

A las ratas preñadas de cada grupo se les extrajo entre 1 a 3 sitios de implantación, incluyendo la placenta y el triángulo mesometrial. Estos fueron diseccionados y sumergidos en un fijador y se dejaron a temperatura ambiente durante un día. Después de la fijación, los tejidos se deshidrataron y se insertaron en Paraplast Plus de acuerdo con el procedimiento estándar. Se cortaron grupos de 10 secciones paralelas de cada sitio de implantación, paralelas al eje mesometrial-fetal. Estas secciones se tiñeron con el método peryódico de ácido de Schiff (PAS) y se realizó una inmunotinción para queratina (KRT) y actina alfa (ACTA) del músculo liso. El método PAS se usó para detectar deposición de fibrinoide dentro de la pared arterial (Caluwaerts et al., 2005; Geusens et al., 2008; Verlohren, Geusens, et al., 2010). KRT se empleó para identificar las células del trofoblasto y se detectó mediante un anticuerpo anti-Pan KRT de ratón (clon MNF116, DAKO) a una dilución de 1:50. ACTA se usó para monitorizar las células del músculo liso y se detectó mediante un anticuerpo anti-ACTA de ratón (clon 1A4, DAKO) a una dilución de 1:100. Ambos anticuerpos se detectaron mediante un conjugado de anti IgG

de ratón-peroxidasa de cabra (Sigma-Aldrich), seguido de tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich) de acuerdo con los procedimientos estandarizados. Se añadió suero de rata (10% Sigma-Aldrich) durante la incubación de los anticuerpos secundarios para disminuir las reacciones inespecíficas

### **3.3.2.5 Análisis cuantitativo de la histología de la arteria espiral**

Todas las secciones teñidas se escanearon a 40X con un escáner microscópico de portaobjetos (SCN400F Leika) y se visualizaron con un software digital (Image Hub, Leika) a un aumento de 10X. En el triángulo mesometrial se contabilizaron el número total de secciones de arterias espirales invadidas y no invadidas. Además, todas las arterias espirales invadidas y no invadidas de cada sección teñida se copiaron en ventanas individuales separadas y colocadas de forma paralela, para evaluar la invasión del trofoblasto y la remodelación de la arteria espiral, mediante un programa de procesamiento de imagen (Imagen J). Todas aquellas arteriolas que tenían un contorno de la luz inferior a 150  $\mu\text{m}$  fueron excluidas del estudio. Se midió la longitud total del contorno de cada arteria espiral y la proporción de la circunferencia de la luz cubierta por trofoblasto endovascular, músculo liso vascular y fibrinoide. La presencia de trofoblasto endovascular, músculo liso vascular y fibrinoide se expresaron como % de la longitud del contorno de la arteria espiral.

## **3.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Todos los parámetros estudiados se promediaron para llevar a cabo las comparaciones entre los distintos grupos y entre los diferentes periodos experimentales. Los valores de los diferentes parámetros que aparecen en el texto, las tablas y las figuras se presentan como valores medios  $\pm$  error estándar. Los diferentes resultados se sometieron a un análisis de varianza de dos factores (two-way ANOVA) con medidas repetidas seguido del test de Fisher. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

# **RESULTADOS**





## 4 RESULTADOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL

*“Determinar el efecto de una ingesta elevada de grasa desde edad temprana sobre la respuesta hemodinámica a la gestación, y los cambios de la presión arterial, en ratas con déficit de nefronas”.*

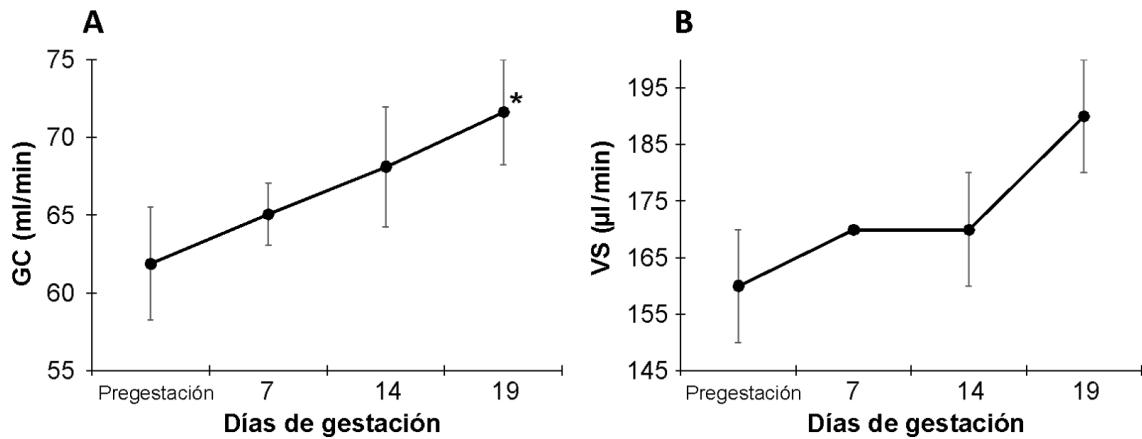
### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

#### 4.2.1 Objetivo específico 1

*“Describir los cambios en la hemodinámica cardíaca, renal y uterina, y su relación con la presión arterial a lo largo de la gestación en ratas control, mediante el empleo de técnicas no invasivas”.*

**Hemodinámica sistémica:** en las *tablas 1, 2, 3 y 4* aparecen representados los valores medios de GC, VS, FC y PAS, respectivamente, obtenidos en los cuatro grupos de animales estudiados para cumplir los objetivos 1, 3 y 4. Así mismo, en la *tabla 5* se muestran los pesos medios correspondientes a estos cuatro grupos de animales a lo largo de la gestación. Los valores de GC y VS se expresan por 100 g de peso corporal para facilitar las comparaciones entre los diferentes grupos experimentales y el grupo control, ya que existen diferencias significativas de peso entre ellos.

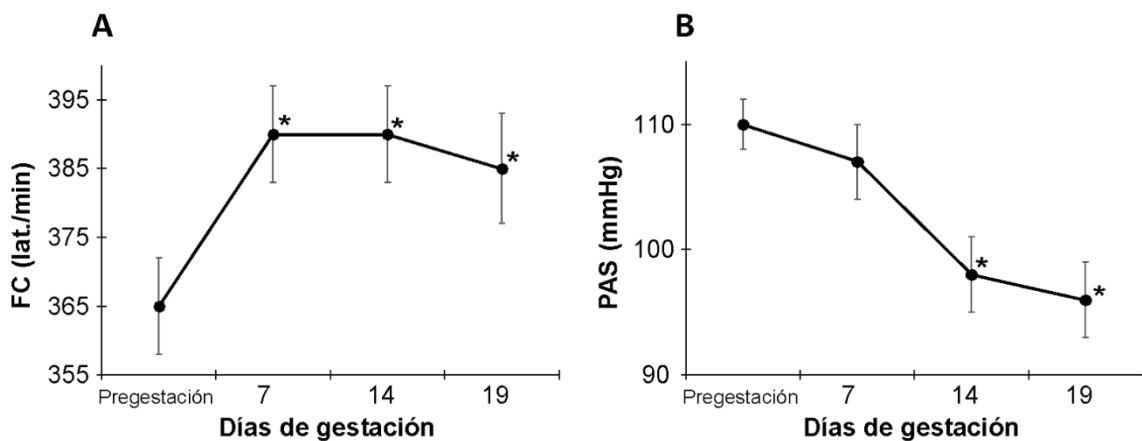
Como se puede observar, tanto el GC (*tabla 1*), como el VS (*tabla 2*), calculados por 100 g de peso corporal, no sufrieron modificaciones en el grupo de ratas control a lo largo de la gestación. Sin embargo, y de acuerdo con los numerosos estudios que muestran los cambios gestacionales absolutos de estos parámetros, los valores de GC y VS obtenidos directamente en nuestro estudio a partir de la imagen ecocardiográfica, sin considerar el peso del animal, mostraron aumentos graduales a lo largo de la gestación, que se pueden observar en las *figuras 1A y 1B*. Así, los valores absolutos del GC en el grupo control aumentaron gradualmente de  $61.8 \pm 3.6$  ml/min previo a la concepción, hasta  $71.6 \pm 3.4$  ml/min ( $p < 0.05$ ) en el día 19. Por otro lado, el VS mostró un patrón similar con un incremento de  $160 \pm 10$   $\mu$ l/min antes de la gestación hasta  $190 \pm 10$   $\mu$ l/min ( $p < 0.05$ ) al final de esta.



**Figura 1:** cambios del gasto cardíaco (ml/min) (A) y volumen sistólico ( $\mu$ l/min) (B) en ratas control a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación.

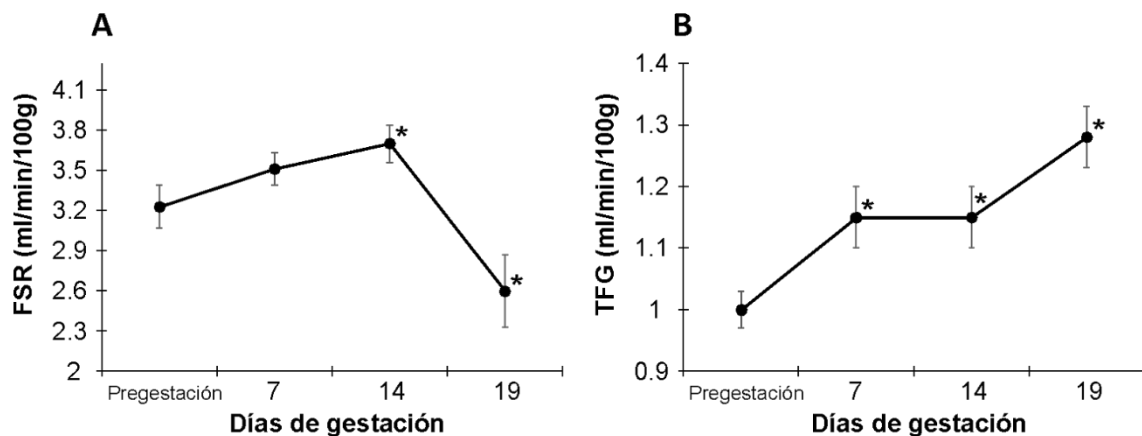
Respecto a la FC (*tabla 3, figura 2A*), esta sufrió un importante aumento ( $p < 0.05$ ) desde  $365.0 \pm 7$  lat./min antes de la concepción hasta  $390 \pm 7$  lat./min en el día 7 de gestación, manteniéndose elevada hasta el día 19. El peso medio (*tabla 5*) de los animales sufrió incrementos ( $p < 0.05$ ) progresivos desde antes de la concepción ( $234 \pm 5$  g) hasta el final de la gestación ( $295 \pm 3$  g).

En cuanto a la PAS, el grupo control mostró un valor de  $110 \pm 2$  mmHg antes de la gestación, que fue descendiendo progresivamente alcanzando valores de  $98 \pm 3$  mmHg y  $96 \pm 3$  mmHg ( $p < 0.05$ ), a mitad y al final del embarazo, respectivamente (*tabla 4, figura 2B*).



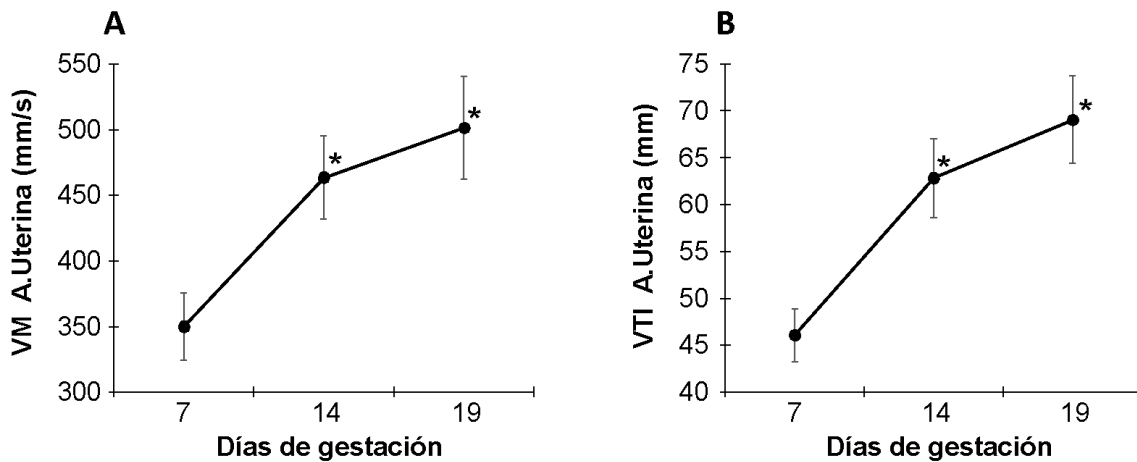
**Figura 2:** cambios de la frecuencia cardíaca (lat./min) (A) y de la presión arterial sistólica (mmHg) (B) en ratas control a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación.

**Hemodinámica renal:** las *tablas 6* y *7* muestran los valores del FSR y de la TFG, respectivamente, en los cuatro grupos experimentales estudiados. Como se puede observar en la *tabla 6* y *figura 3A*, el grupo control mostró valores de FSR en el día 14 de gestación ( $3.70 \pm 0.14$  ml/min/100g) significativamente mayores que los observados en la etapa pregestacional ( $3.23 \pm 0.16$  ml/min/100g). En la última semana de gestación, este parámetro descendió hasta alcanzar niveles inferiores ( $p < 0.05$ ) a los observados en el periodo previo a la concepción ( $2.60 \pm 0.27$  ml/min/100g). A diferencia del FSR, la TFG (*tabla 7, figura 3B*) del grupo control, mostró incrementos progresivos a lo largo de toda la gestación ( $p < 0.05$ ), alcanzando su valor máximo en el día 19 ( $1.28 \pm 0.05$  vs.  $1.00 \pm 0.03$ , día 19 vs. pregestación).



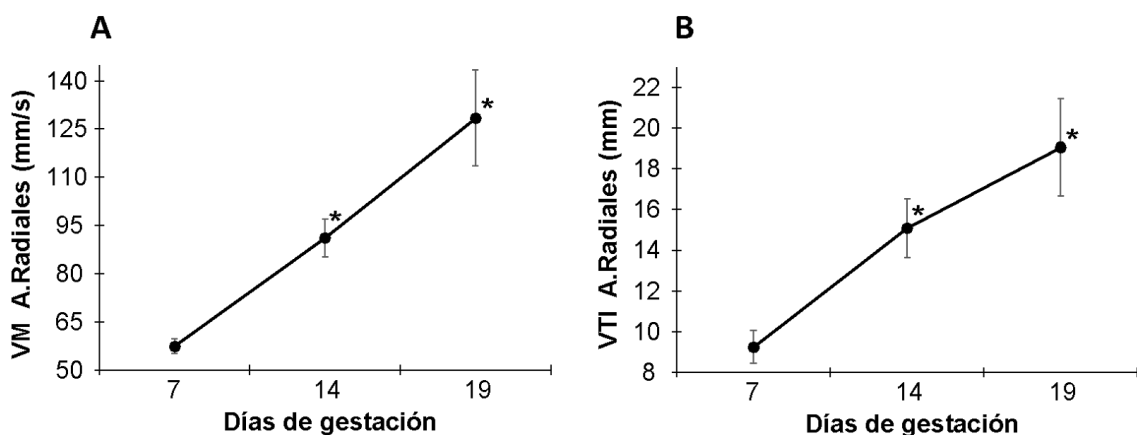
**Figura 3:** cambios de flujo sanguíneo renal (ml/min/100g) (A) y de la tasa de filtración glomerular (ml/min/100g) (B) en ratas control a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación.

**Hemodinámica uterina:** en las *tablas 8, 9* y *10* se muestran los valores de las velocidades de flujo de la arteria uterina: PSV, EDV y VM de todos los grupos experimentales estudiados. Tanto la PSV como la EDV (*tablas 8* y *9*) aumentaron ( $p < 0.05$ ) progresivamente desde el día 7 hasta el final de la gestación en el grupo de ratas control. La VM (*tabla 10, figura 4A*) de la arteria uterina en el grupo control mostró un valor de  $350.0 \pm 26.0$  mm/s en el día 7 de gestación, y fue aumentando gradualmente ( $p < 0.05$ ) hasta alcanzar un valor de  $502.0 \pm 39.0$  mm/s en la última semana. La VTI (*tabla 11, figura 4B*) mostró un patrón de comportamiento similar, ya que sufrió incrementos ( $p < 0.05$ ) paulatinos desde el día 7 ( $46.0 \pm 3.0$  mm) hasta el final de la gestación ( $69.0 \pm 5.0$  mm).



**Figura 4:** cambios de la velocidad media (mm/s) (A) y de la velocidad integral en el tiempo (mm) (B) de la arteria uterina en ratas control a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. día 7.

En las *tablas 12, 13 y 14* se pueden ver los valores correspondientes a las velocidades de flujo de las arterias radiales, PSV, EDV y VM de todos los grupos experimentales estudiados. Como ocurría con estos parámetros en la arteria uterina del grupo de animales control, tanto la PSV (*tabla 12*) como la EDV (*tabla 13*) fueron aumentando progresivamente ( $p < 0.05$ ) desde el día 7 hasta el final de la gestación. La VM (*tabla 14*) de las arterias radiales en el grupo control fue de  $58 \pm 2$  mm/s en el día 7, aumentando ( $p < 0.05$ ) hasta  $128 \pm 15$  mm/s (*figura 5A*) en el día 19. La VTI (*tabla 15*) presentó un patrón de comportamiento similar, ya que mostró incrementos paulatinos ( $p < 0.05$ ) desde el día 7 de gestación ( $9 \pm 1$  mm) hasta el final de la última etapa gestacional ( $19 \pm 2$  mm) (*figura 5B*).



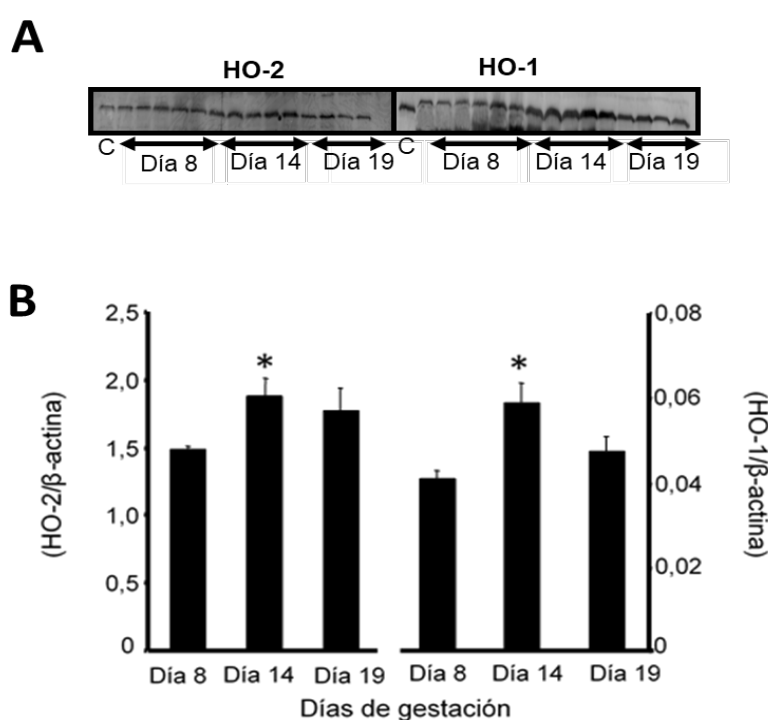
**Figura 5:** cambios de la velocidad media (mm/s) (A) y de la velocidad integral en el tiempo (mm) (B) de las arterias radiales en ratas control a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. día 7.

## 4.2.2 Objetivo específico 2

*“Determinar los cambios en los parámetros hemodinámicos en las arterias uteroplacentarias a lo largo de la gestación en ratas con alteraciones en el remodelado de las arterias espirales y aumentos de la presión arterial inducidos por una disminución de la actividad de la hemo-oxigenasa.*

### 4.2.2.1 Expresión de HO-1 y HO-2 en la placenta y triángulo mesometrial

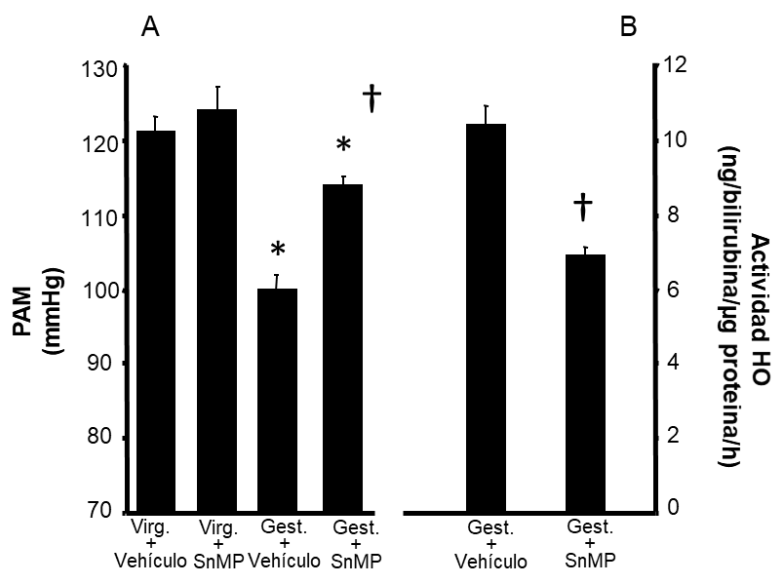
En la *figura 6A*, que aparece a continuación, se muestra un western blot representativo de la expresión de HO-1 y HO-2 en el lugar de implantación (placenta + triángulo mesometrial) de ratas control a lo largo de la gestación. El análisis de densitometría (*figura 6B*) reveló que ambas isoformas se expresan en los sitios de implantación durante la gestación. Los niveles de HO-1 y HO-2 alcanzaron su punto máximo en el día 14, siendo significativamente más altos que los observados en el día 8 de gestación. Además, ambas isoformas disminuyeron ligeramente al final de la misma.



**Figura 6:** expresión de HO-1 y HO-2 en el sitio de implantación de la rata durante la gestación; western blot representativo; C significa proteína control (A). Cuantificación de la expresión de proteínas mediante densitometría; los valores densitométricos se expresan en relación con la expresión de β-actina(B). \*  $P < 0.05$  vs. día 8.

#### 4.2.2.2 Presión arterial en ratas conscientes

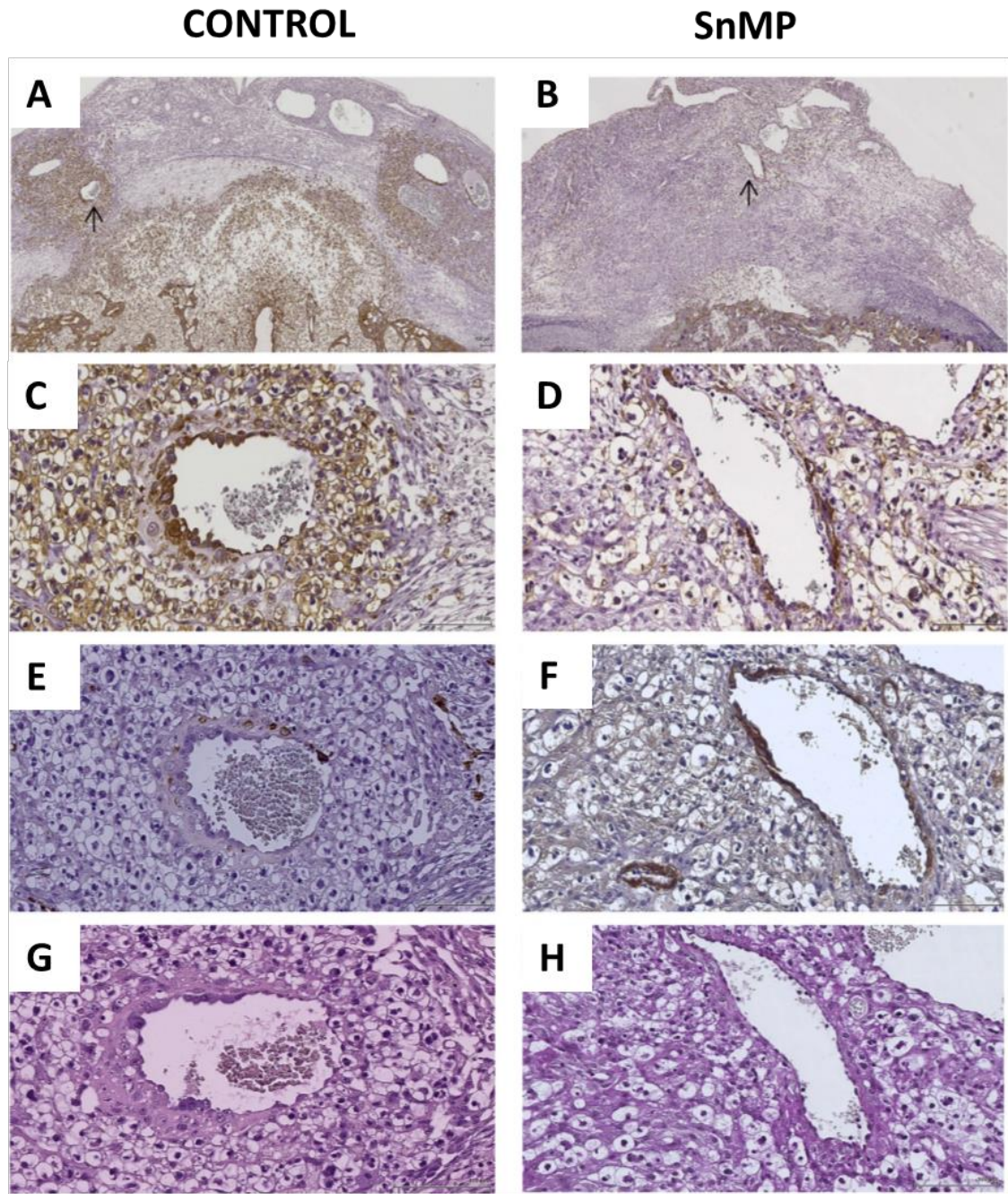
En la siguiente (**figura 7A**) se comparan los valores de PAM en los grupos de ratas vírgenes y preñadas tratadas con vehículo o con el inhibidor de la enzima HO, SnMP. Como muestra la figura, en el día 19 de gestación, las ratas gestantes del grupo control presentaron niveles de PAM significativamente más bajos que las ratas vírgenes tratadas con vehículo ( $100 \pm 2$  mmHg vs.  $121 \pm 2$  mmHg, respectivamente). La inhibición de la actividad de HO con la SnMP indujo un aumento ( $p < 0.05$ ) en la PAM en las ratas gestantes ( $100 \pm 2$  mmHg vs.  $114 \pm 1$  mmHg) que no se observó en las ratas vírgenes ( $121 \pm 2$  mmHg vs.  $124 \pm 3$  mmHg) tratadas con el inhibidor, y que estuvo asociado con una reducción significativa de la actividad de la HO placentaria en el día 19 de gestación ( $10.4 \pm 0.5$  vs.  $6.9 \pm 0.2$  ng / bilirrubina /  $\mu$ g proteína / h) (**figura 7B**). Estos resultados demuestran que 5 días después de la administración, la dosis de la SnMP utilizada en nuestro estudio tuvo un efecto inhibitorio significativo sobre la actividad de la HO. Las ratas preñadas con un aumento de la PAM al final de la gestación tuvieron una tasa de reabsorción fetal más alta ( $p < 0.05$ ) (19%) que las ratas del grupo control (5%).



**Figura 7:** PAM en ratas vírgenes (Virg.) y gestantes (Gest.) tratadas intraperitonealmente con vehículo o SnMP (A). Actividad de la HO en el sitio de implantación en ratas preñadas tratadas intraperitonealmente con vehículo o SnMP (B). \*  $P < 0.05$  vs. ratas control vírgenes; †  $P < 0.05$  vs. ratas control gestantes.

#### 4.2.2.3 Remodelado endovascular asociado a los trofoblastos en el triángulo mesometrial

Se evaluaron un total de 13 sitios de implantación procedentes de 6 ratas gestantes control, y 12 obtenidos de 7 ratas gestantes tratadas con el inhibidor de la HO. La **figura 8** muestra imágenes representativas de la invasión trofoblástica en el triángulo mesometrial de una rata gestante control (**figura 8A**) y una rata preñada tratada con el inhibidor de la HO (**figura 8B**) en el día 19 de gestación. En dicha imagen también se muestran cortes transversales paralelos de una arteria espiral inmunoteñida con citokeratina, PAS y  $\alpha$ -actina de una rata control (**figuras 8C, 8E y 8G**, respectivamente) y de una rata gestante tratada con SnMp (**figuras 8D, 8F, 8H**, respectivamente). Al igual que se ha descrito previamente (Caluwaerts et al., 2005), los trofoblastos no recubrían por completo el diámetro interior de las arteriolas espirales del triángulo mesometrial endovascular (**figuras 8C y 8D**). Además, se observó material fibrinoide debajo de la capa de trofoblastos endovasculares (**figuras 8G y 8H**). En las **figuras 8E y 8F**, también se puede observar la fragmentación del músculo liso vascular en los vasos invadidos. En el día 19 de gestación, el porcentaje de arterias espirales invadidas por el trofoblasto fue similar en ambos grupos (19% vs. 18%, respectivamente). Sin embargo, en las diferentes secciones arteriales, la proporción de la luz del vaso cubierta por trofoblastos fue significativamente menor ( $p < 0.001$ ) en las ratas preñadas tratadas con el inhibidor de la HO ( $21 \pm 3\%$ ) que en las ratas gestantes control ( $59 \pm 5\%$ ) (**tabla 16**). La cantidad de fibrinoide en las arterias espirales, expresado como % de la longitud total del contorno de la arteria espiral (**tabla 16**), mostró un patrón similar, con menor ( $p < 0.05$ ) deposición de fibrinoide ( $22 \pm 3\%$ ) en las ratas preñadas en las que la actividad del sistema HO estaba reducida que en las ratas del grupo control ( $42 \pm 7\%$ ). Por el contrario, la longitud de la capa de músculo liso vascular en relación con el contorno total del vaso fue significativamente mayor ( $33 \pm 5\%$ ) en las ratas preñadas tratadas con el inhibidor de la HO que en las ratas preñadas control ( $16 \pm 5\%$ ) (**tabla 16**).



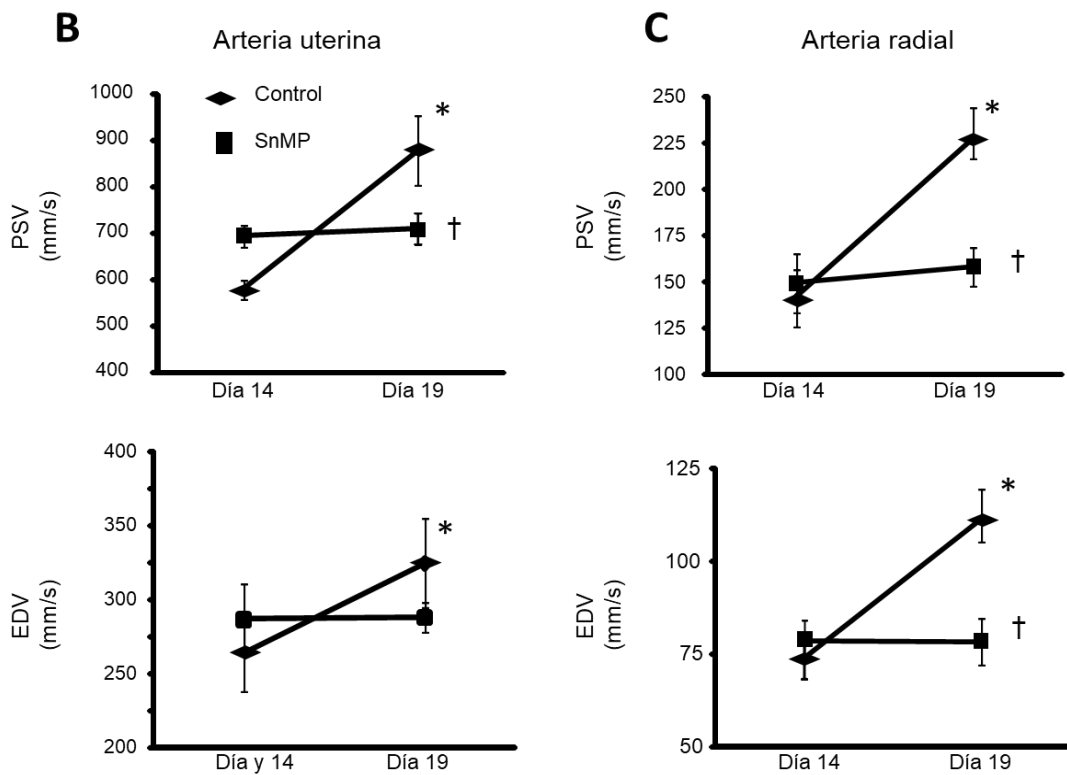
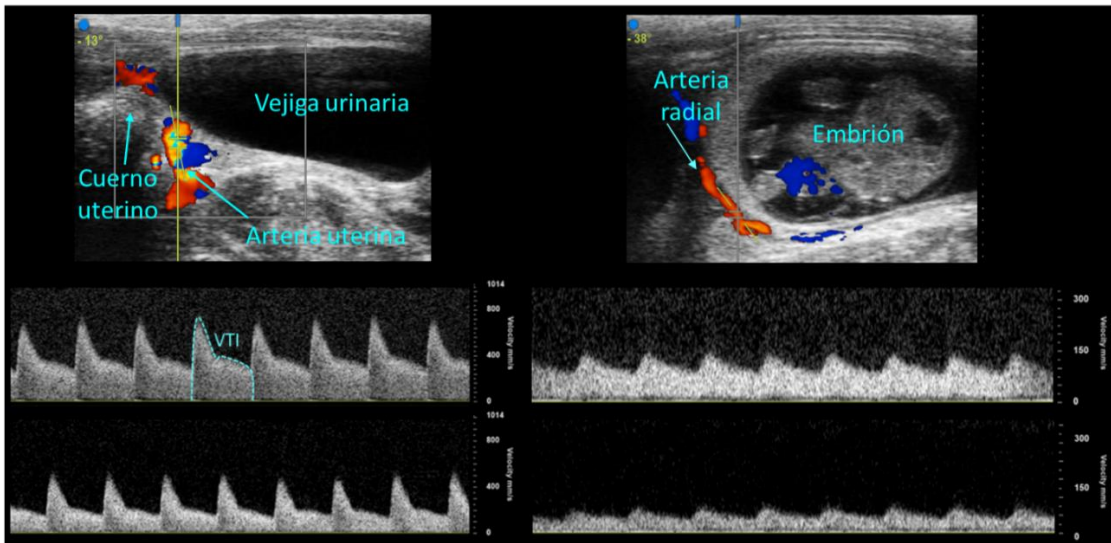
**Figura 8:** triángulo mesometrial de una rata gestante control (**A**) y una rata gestante tratada con SnMP (**B**) en el día 19 de gestación teñidos con citokeratina. Las flechas en A y B indican la localización del vaso ampliado en las siguientes imágenes. Secciones transversales paralelas de una arteria espiral inmunoteñida para citokeratina,  $\alpha$ -actina y PAS de una rata gestante control (**C**, **E**, **G**) y de una rata gestante tratada con la SnMP (**D**, **F**, **H**).



#### 4.2.2.4 Velocidad de flujo de las arterias uterinas y radiales.

La *figura 9A* muestra un espectro representativo de las velocidades de flujo obtenidas de la arteria uterina y las arterias radiales mediante ultrasonografía Doppler en ambos grupos experimentales de ratas gestantes en el día 19 de gestación. Como se muestra en las *figuras 9B* y *9C*, la PSV y la EDV aumentaron significativamente desde el día 14 hasta el día 19 en la arteria uterina y en las arterias radiales de las ratas gestantes control. Sin embargo, en las ratas preñadas tratadas con el inhibidor de la actividad de la HO, estos parámetros fueron similares en los días 14 y 19 de gestación. En la *figura 9A* también se puede observar que en el día 19 de gestación, la PSV y la EDV fueron menores en las arterias uterinas y radiales de las ratas preñadas con actividad de la HO reducida que en los animales del grupo control. La VM y la VTI siguieron el mismo patrón (*tabla 17*), mostrando un marcado aumento en el día 19 de gestación en las ratas del grupo control y sin cambios en las ratas preñadas con actividad de la HO disminuida.

A

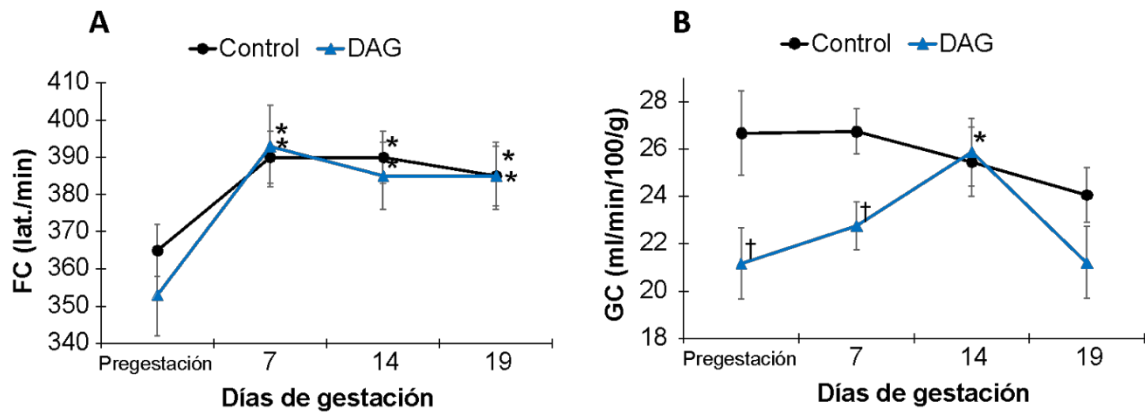


**Figura 9:** espectro de velocidades de flujo obtenido de la arteria uterina y de las arterias radiales mediante ultrasonografía Doppler de una rata de gestante control y una rata gestante tratada con SnMP en el día 19 de gestación (A). Cambios en la PSV y la EDV de la arteria uterina en el día 14 y día 19 de gestación, en ratas gestantes tratadas con vehículo o con SnMP (B). Cambios de la PSV y la EDV de la arteria radial en los días 14 y 19 de gestación, en ratas gestantes tratadas con vehículo o con SnMP (C). \*  $P < 0.05$  vs. día 14 de gestación.

### 4.2.3 Objetivo específico 3

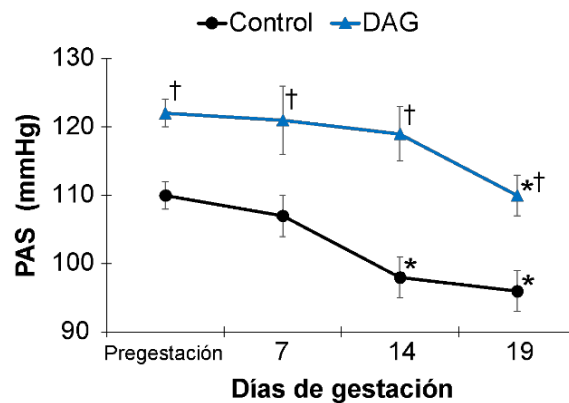
*“Analizar la influencia de una alta ingesta de grasa desde edad temprana en la respuesta hemodinámica a la gestación y su relación con los cambios de la presión arterial”.*

**Hemodinámica sistémica:** en el grupo de ratas DAG, el GC fue inferior ( $p < 0.05$ ) que el del grupo control, tanto en la etapa previa a la concepción ( $21.2 \pm 1.5$  vs.  $26.7 \pm 1.8$  ml/min/100g) como en la primera semana de gestación ( $22.8 \pm 1.0$  vs.  $26.7 \pm 1.0$  ml/min/100g), pero experimentó un ascenso significativo el día 14 ( $25.9 \pm 1.4$  ml/min/100g) (*tabla 1, figura 10B*). Sin embargo, este valor no fue diferente del observado en el grupo control durante la misma etapa gestacional. En la última semana de gestación este parámetro descendió a niveles similares a los observados en el grupo control. Los cambios en el VS del grupo de ratas DAG mostraron un patrón similar al observado para el GC, aunque únicamente se observaron diferencias significativas con respecto al grupo control en el día 7 de gestación ( $54 \pm 2$   $\mu$ l/100g vs.  $67 \pm 2$   $\mu$ l/100g) (*tabla 2*). En contraste, la FC aumentó paulatinamente a lo largo de toda la gestación ( $p < 0.05$ ), no mostrando ninguna diferencia con el grupo control (*tabla 3, figura 10A*). Los animales sometidos a una alta ingesta de grasa desde edad temprana mostraron un peso previo a la gestación mayor ( $p < 0.05$ ) que los animales del grupo control ( $264 \pm 8$  g vs.  $234 \pm 4$  g, ratas obesas vs ratas control) (*tabla 5*). Al igual que ocurría en los animales control, su peso aumentó progresivamente hasta el final, pero alcanzando valores significativamente mayores en todas las etapas gestacionales ( $286 \pm 7$  g,  $302 \pm 7$  g y  $350 \pm 9$  g vs.  $244 \pm 3$  g,  $268 \pm 3$  g y  $295 \pm 3$  g, ratas DAG vs. ratas control en los días 7, 14 y 19 de gestación). A pesar de esta diferencia de peso, el porcentaje de cambio de este parámetro a lo largo de la gestación, únicamente fue diferente del observado en el grupo control ( $p < 0.05$ ) al final de la misma. Así, en el día 19 el incremento de peso en las ratas DAG fue de un 33% frente a un 26% en el grupo de ratas control.



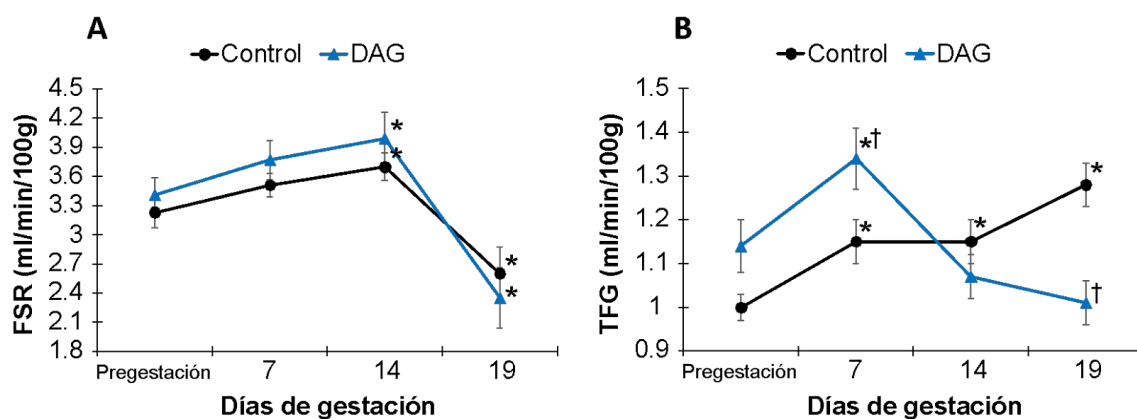
**Figura 10:** cambios de la frecuencia cardíaca (lat./min) (A) y del gasto cardíaco (ml/min/100g) (B) en el grupo de ratas control y grupo con alta ingesta de grasa (DAG) a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  control vs. DAG.

**En relación a los niveles de PAS,** las ratas DAG mostraron una PAS más elevada ( $p < 0.05$ ) que la del grupo control en el período pregestacional ( $122 \pm 2$  vs.  $110 \pm 2$  mmHg) y durante toda la gestación (*tabla 4, figura 11*). A pesar de ello, los cambios en la PAS durante la gestación en este grupo de animales siguieron un patrón similar al del grupo control, mostrando descensos significativos al final de la misma.



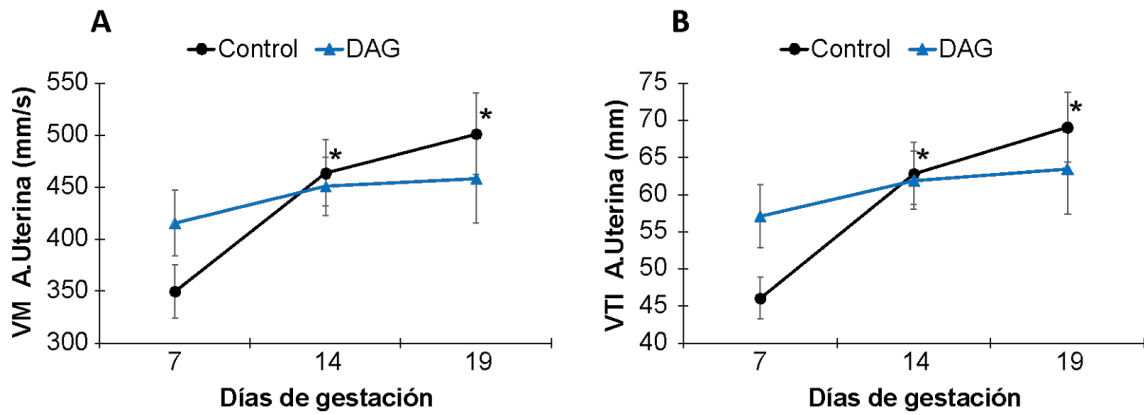
**Figura 11:** cambios de la presión arterial sistólica (mmHg) en el grupo de ratas control y grupo con alta ingesta de grasa (DAG) a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control.

**Hemodinámica renal:** en la *tabla 6* y *figura 12A* se puede observar que los cambios en el FSR a lo largo de la gestación en el grupo de ratas DAG fueron similares a los observados en el grupo control, de manera que este parámetro alcanzó su valor máximo en el día 14 ( $3.99 \pm 0.27$  ml/min/100g vs.  $3.41 \pm 0.18$  ml/min/100g; día 14 vs. pregestación), y descendió posteriormente ( $p < 0.05$ ) hasta niveles inferiores a los previos a la gestación ( $2.35 \pm 0.31$  ml/min/100g). Por el contrario, la TFG (*tabla 7*, *figura 12B*) en el grupo de ratas DAG únicamente aumentó ( $p < 0.05$ ) en la primera semana ( $1.34 \pm 0.07$  vs.  $1.14 \pm 0.06$  ml/min/100g, día 7 vs. pregestación) y disminuyó posteriormente, alcanzando incluso valores inferiores ( $p < 0.05$ ) a los del grupo control al final de la gestación ( $1.01 \pm 0.05$  vs.  $1.28 \pm 0.05$  ml/min/100g).



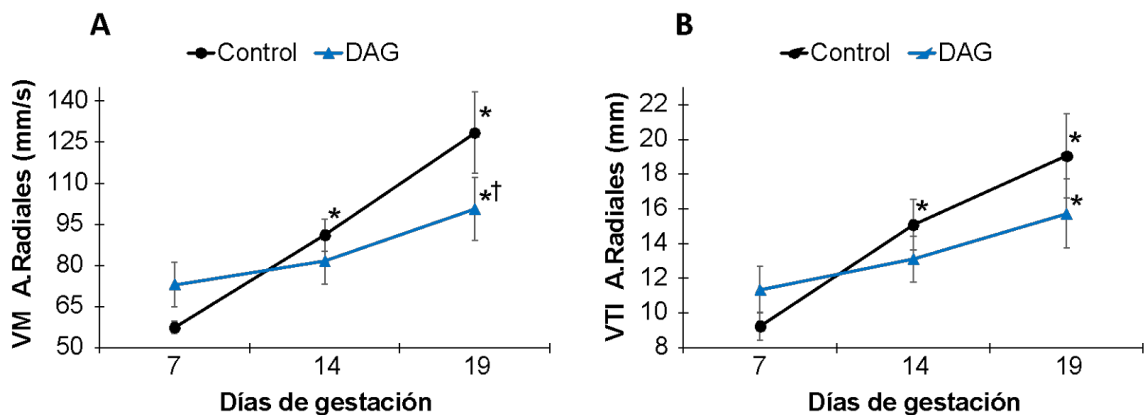
**Figura 12:** cambios del flujo sanguíneo renal (ml/min/100g) (A) y de la tasa de filtración glomerular (ml/min/100g) (B) en el grupo de ratas control y grupo con alta ingesta de grasa (DAG) a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  control vs. DAG.

**Hemodinámica uterina:** la PSV (*tabla 8*), la VM y la VTI (*tablas 10-11*, *figura 13*) de la arteria uterina permanecieron invariables a lo largo de toda la gestación en el grupo de ratas DAG, y no mostraron diferencias significativas con los observadas en el grupo control. Únicamente la EDV (*tabla 9*) sufrió un incremento significativo el día 19, pero sin llegar a alcanzar los niveles observados en el grupo control ( $245 \pm 20$  vs.  $306 \pm 22$  mm/s, ratas DAG vs. ratas control) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 13:** cambios de la velocidad media (mm/s) (A) y de la velocidad integral en el tiempo (mm) (B) de la arteria uterina en el grupo de ratas control y grupo con alta ingesta de grasa (DAG) a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. 7 días.

**Arterias radiales:** en el grupo de ratas DAG, la PSV (*tabla 12*) y la VTI (*tabla 15, figura 14B*) de las arterias radiales aumentaron significativamente desde valores de  $96 \pm 10$  mm/s y  $11 \pm 1$  mm, respectivamente, en el día 7, a valores de  $141 \pm 16$  mm/s y  $16 \pm 2$  mm en el día 19 de gestación. Estos valores no fueron significativamente diferentes de los observados en el grupo control. Del mismo modo, la VM (*tabla 14, figura 14A*) mostró incrementos significativos a término, alcanzando niveles de  $101 \pm 12$  mm/s frente a los  $73 \pm 8$  mm/s observados en la primera semana de gestación. Sin embargo, en este caso su valor fue menor ( $p < 0.05$ ) que el obtenido en el grupo control ( $128 \pm 15$  mm/s). En cuanto a la EDV (*tabla 13*) en la arteria radial fue similar a lo largo de la gestación, pero al igual que ocurría con la VM, en el día 19 de gestación, su valor fue también menor ( $p < 0.05$ ) que el observado en el grupo control.

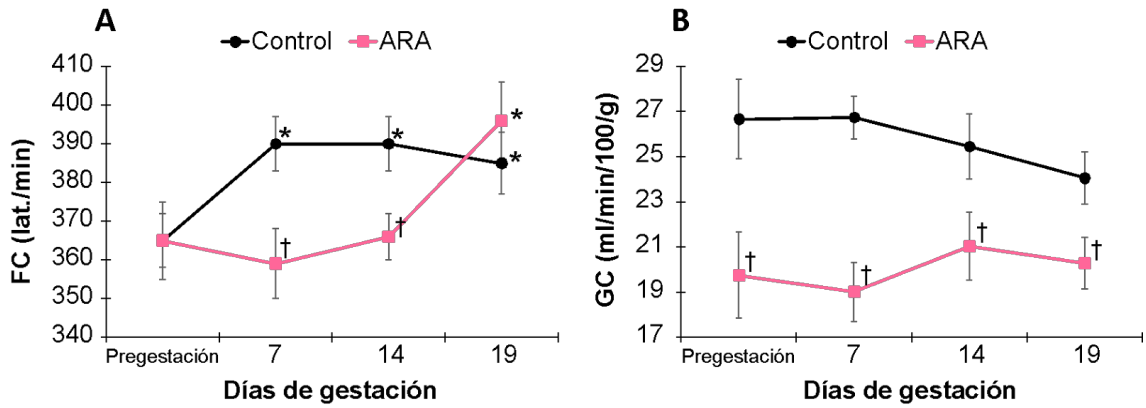


**Figura 14:** cambios de la velocidad media (mm/s) (A) y de la velocidad integral en el tiempo (mm) (B) de las arterias radiales en el grupo de ratas control y grupo con alta ingesta de grasa (DAG) a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  control vs. DAG.

#### 4.2.4 Objetivo específico 4

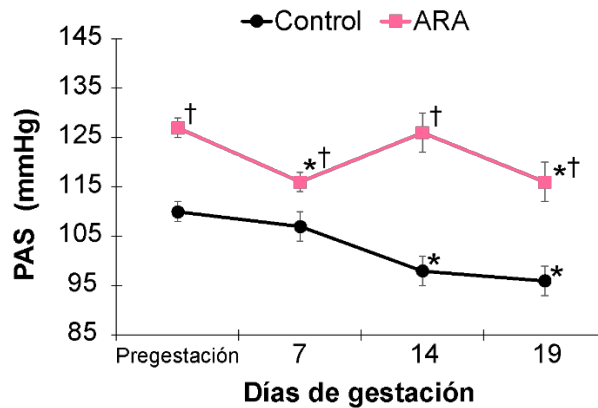
*“Evaluar la respuesta hemodinámica a la gestación y la evolución de la presión arterial en ratas con déficit de nefronas desde la etapa perinatal”.*

**Hemodinámica sistémica:** como se puede observar en la *tabla 1* y en la *figura 15B*, el grupo de ratas ARA mostró un GC inferior ( $p < 0.05$ ) al del grupo control en la etapa pregestacional ( $19.8 \pm 1.9$  ml/min/100g vs.  $26.7 \pm 1.8$  ml/min/100g). Además, al igual que ocurría en el grupo control, este parámetro permaneció invariable a lo largo de la gestación. El VS se comportó de forma similar, mostrando valores previos a la gestación más bajos ( $p < 0.05$ ) que los observados en el grupo control ( $53 \pm 5$   $\mu$ l/100g vs.  $69 \pm 4$   $\mu$ l/100g) (*tabla 2*). Por el contrario, la FC (*tabla 3, figura 15A*), aunque fue menor ( $p < 0.05$ ) en el grupo de ratas ARA en los días 7 y 14 de gestación, sufrió un incremento significativo al final de esta ( $396 \pm 10$  lat./min vs.  $365 \pm 10$  lat./min, día 19 vs. periodo pregestacional), alcanzando valores similares a los observados en el grupo control. Las ratas ARA presentaron un peso previo a la gestación similar al de las ratas control ( $244 \pm 8$  g vs.  $234 \pm 5$  g, ratas ARA vs. ratas control). El peso de estos animales (*tabla 5*) aumentó progresivamente, alcanzando valores significativamente mayores que los del grupo control en el día 7 ( $272 \pm 3$  g vs.  $244 \pm 3$ , ratas ARA vs. ratas control), día 14 ( $299 \pm 4$  g vs.  $268 \pm 3$  g, ratas ARA vs. ratas control) y día 19 de gestación ( $343 \pm 8$  g vs.  $295 \pm 3$  g, ratas ARA vs. ratas control). Cuando se compararon los incrementos de peso de ambos grupos a lo largo de la gestación, calculados como porcentaje de aumento con respecto al peso previo a la gestación, se observó que el grupo de ratas ARA mostraba mayores incrementos ( $p < 0.05$ ) de peso que el grupo control en todos los periodos gestacionales. Así, mientras que en el grupo control, el peso aumentó un 4%, 15% y 26% en los días 7, 14 y 19, respectivamente, en el grupo de ratas ARA estos aumentos fueron del 12%, 23% y 40% con respecto al periodo previo a la gestación.



**Figura 15:** cambios en la frecuencia cardíaca (lat./min) (A) y en el gasto cardíaco (ml/min/100g) (B) en el grupo de ratas control y grupo con reducido número de nefronas (ARA) a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control.

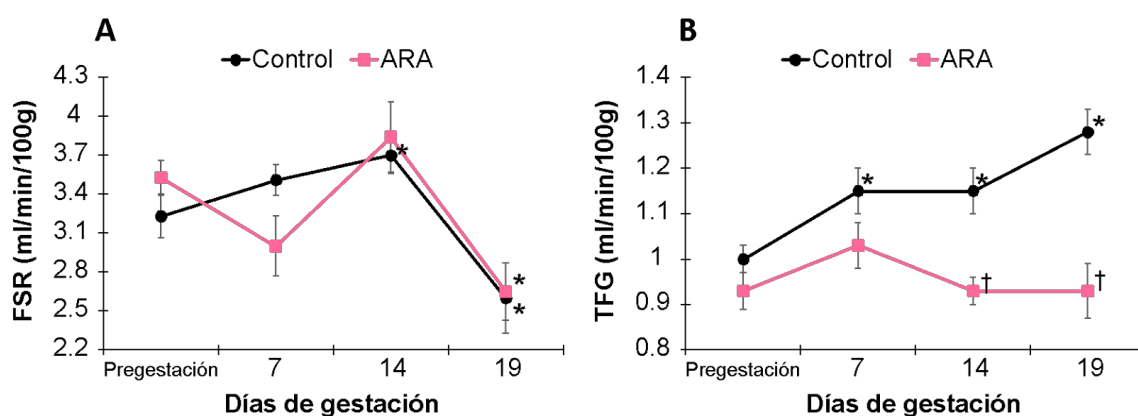
Con respecto a la PAS, el grupo de ratas ARA mostró una PAS (*tabla 4, figura 16*) más alta que la del grupo control tanto antes de la concepción ( $127 \pm 2$  vs.  $110 \pm 2$  mmHg, ratas ARA vs. ratas control) como a lo largo de la gestación ( $p < 0.05$ ), a pesar de que este parámetro descendió de forma significativa en este grupo de animales al final de la misma ( $116 \pm 4$  mmHg vs.  $127 \pm 2$  mmHg, día 19 vs. día 7).



**Figura 16:** cambios en la presión arterial sistólica (mmHg) en el grupo de ratas control y grupo con reducido número de nefronas (ARA) a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control.

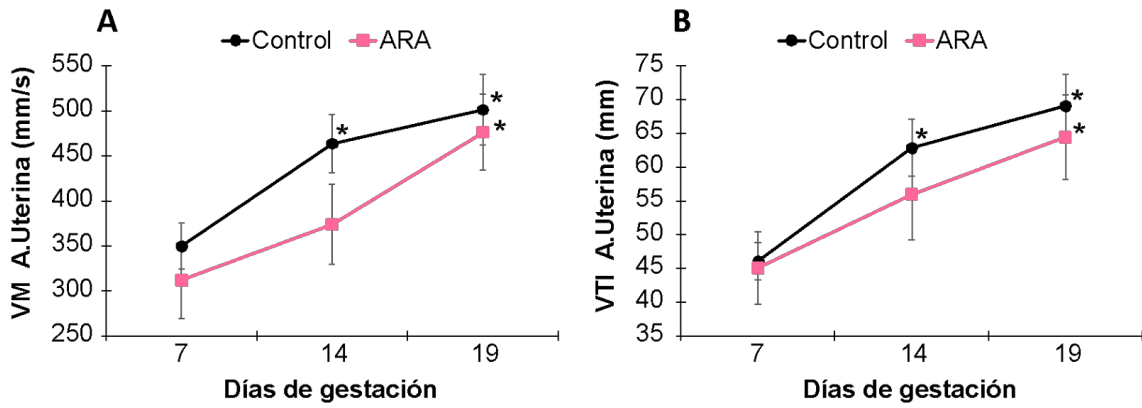


**Hemodinámica renal:** en la *figura 17A* y *tabla 6* se puede observar que el grupo de ratas ARA mostró valores de FSR similares a los del grupo control en la etapa previa a la concepción. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurría en este grupo, este parámetro no sufrió incrementos significativos en los animales ARA a mitad de la gestación. A pesar de ello, los valores de FSR no fueron diferentes entre ambos grupos. Finalmente, en el día 19, el FSR descendió ( $p < 0.05$ ) en el grupo de ratas ARA hasta alcanzar valores similares a los observados en el grupo control. En contraste con las ratas gestantes control, la TFG (*tabla 7, figura 17B*) en este grupo no mostró cambios significativos en ninguna de las etapas gestacionales. Además, este parámetro fue significativamente menor que en el grupo control en los días 14 ( $0.93 \pm 0.03$  ml/min/100g vs.  $1.15 \pm 0.05$  ml/min/100g) y 19 ( $0.93 \pm 0.06$  ml/min/100g vs.  $1.28 \pm 0.05$  ml/min/100g) de gestación.



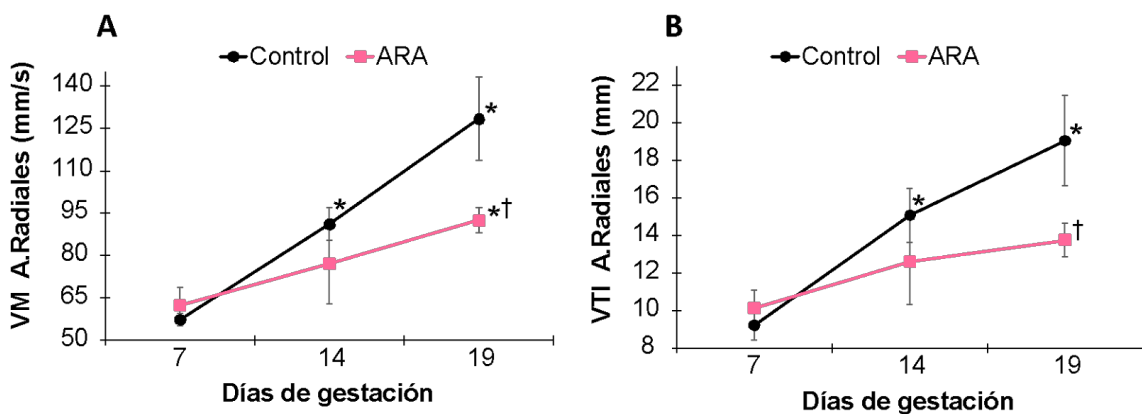
**Figura 17:** cambios del flujo sanguíneo renal (ml/min/100g) (A) y de la tasa de filtración glomerular (ml/min/100g) (B) en el grupo de ratas control y grupo con reducido número de nefronas (ARA) a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control.

**Hemodinámica uterina:** la PSV, EDV, VM y la VTI de la arteria uterina (*tablas 8-11*) aumentaron gradualmente desde el día 7 al 19 de gestación en las ratas ARA, mostrando un patrón similar al observado en el grupo de ratas control. Como se muestra en la *figura 18*, la VM y la VTI aumentaron ( $p < 0.05$ ) desde valores de  $312 \pm 43$  mm/s y  $45 \pm 5$  mm, respectivamente, en el día 7 hasta valores de  $476 \pm 42$  mm/s y  $65 \pm 6$  mm en el día 19 de gestación. A diferencia de lo que ocurría en el grupo control, los incrementos de estos parámetros en el grupo de ratas ARA, únicamente fueron estadísticamente significativos al final de la gestación. A pesar de ello, ni la VM ni la VTI fueron diferentes entre los dos grupos en ninguna de las etapas gestacionales.



**Figura 18:** cambios de la velocidad media (mm/s) (A) y de la velocidad integral en el tiempo (mm) (B) de la arteria uterina en el grupo de ratas control y grupo con reducido número de nefronas (ARA) a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. 7 días.

**Arterias radiales:** en el grupo de ratas ARA, la PSV, la EDV y la VM de las arterias radiales (*tablas 12-14, figura 19A*) aumentaron gradualmente desde el día 7 hasta el final de la gestación. Estos incrementos solo fueron estadísticamente significativos en el día 19 y, además, fueron menores ( $p < 0.05$ ) que los observados en el grupo control. Por el contrario, la VTI (*tabla 15, figura 19B*) de las arterias radiales en el grupo de ratas ARA permaneció invariable a lo largo de todas las etapas gestacionales. Al igual que ocurría con los parámetros anteriores, su valor fue inferior a la del grupo control en el día 19 de gestación ( $14 \pm 1$  vs.  $19 \pm 2$  mm/s, grupo ARA vs. grupo control) ( $p < 0.05$ ).

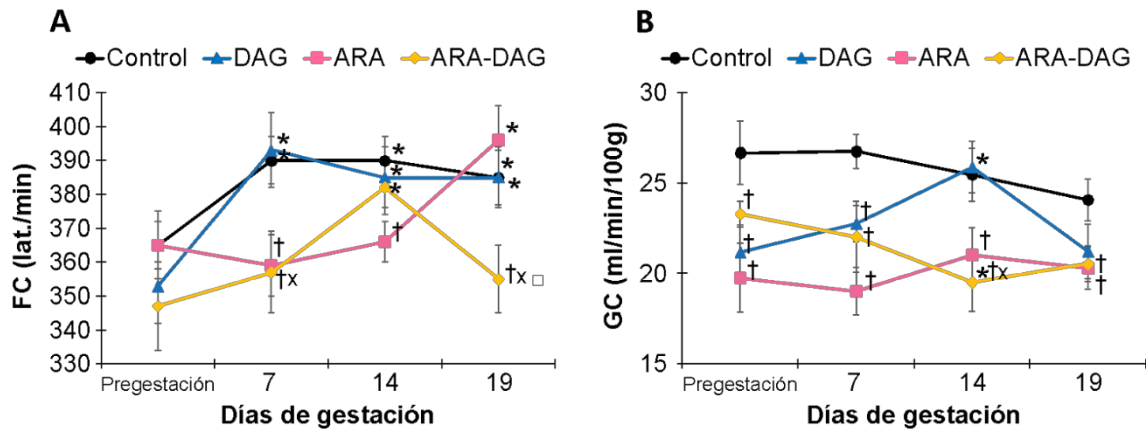


**Figura 19:** cambios de la velocidad media (mm/s) (A) y de la velocidad integral en el tiempo (mm) (B) de las arterias radiales en el grupo de ratas control y grupo con reducido número de nefronas (ARA) a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. 7 días; †  $P < 0.05$  control vs. ARA.

#### 4.2.5 Objetivo específico 5

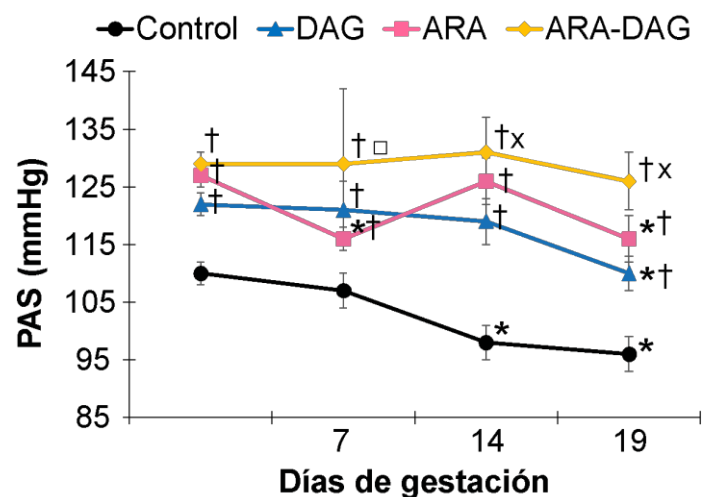
***“Determinar si la ingesta elevada de grasa desde edad temprana supone un factor de riesgo añadido para el desarrollo de alteraciones en la respuesta hemodinámica a la gestación y en la presión arterial en ratas con déficit de nefronas”.***

**Hemodinámica sistémica:** la alta ingesta de grasa en el grupo de animales con reducido número de nefronas desde la etapa perinatal provocó disminuciones significativas del GC en la etapa pregestacional ( $23.3 \pm 0.7$  ml/min/100g vs.  $26.7 \pm 1.8$  ml/min/100g, grupo ARA-DAG vs. grupo control), que fueron similares a las observadas en el grupo de ratas ARA ( $19.8 \pm 1.9$  ml/min/100g) y en el grupo de ratas DAG ( $21.2 \pm 1.5$  ml/min/100g) (*tabla 1, figura 20B*). Sin embargo, mientras que el GC no sufrió modificaciones importantes a lo largo de la gestación en el resto de grupos experimentales, en este grupo se observó una disminución significativa en este parámetro en el día 14 de gestación ( $19.5 \pm 1.6$  ml/min/100g vs.  $23.3 \pm 0.7$  ml/min/100g, día 14 vs. día 7), que pudo estar causada por un descenso ( $p < 0.05$ ) paralelo en el VS ( $54 \pm 5$   $\mu$ l/min vs.  $68 \pm 4$   $\mu$ l/min, día 14 vs. día 7) (*tabla 2*), ya que la FC aumentó en esta etapa hasta niveles similares a los observados en el grupo control y en el resto de grupos experimentales (*tabla 3, figura 20A*). Por el contrario, la FC en el día 19 mostró valores inferiores ( $p < 0.05$ ) a los de todos los demás grupos. El peso previo a la gestación en este grupo de animales fue mayor ( $p < 0.05$ ) que el observado en el grupo control ( $270 \pm 6$  g vs.  $234 \pm 5$  g, ratas ARA-DAG vs. ratas control) y en el grupo de ratas ARA ( $244 \pm 8$  g). Este parámetro sufrió incrementos a lo largo de la gestación y sus valores fueron significativamente mayores que los del grupo control y el grupo de ratas ARA a lo largo de la gestación. Además, del mismo modo que ocurría en el grupo de ratas ARA el porcentaje de cambio de este parámetro fue mayor ( $p < 0.05$ ) que en el grupo control en los tres periodos gestacionales.



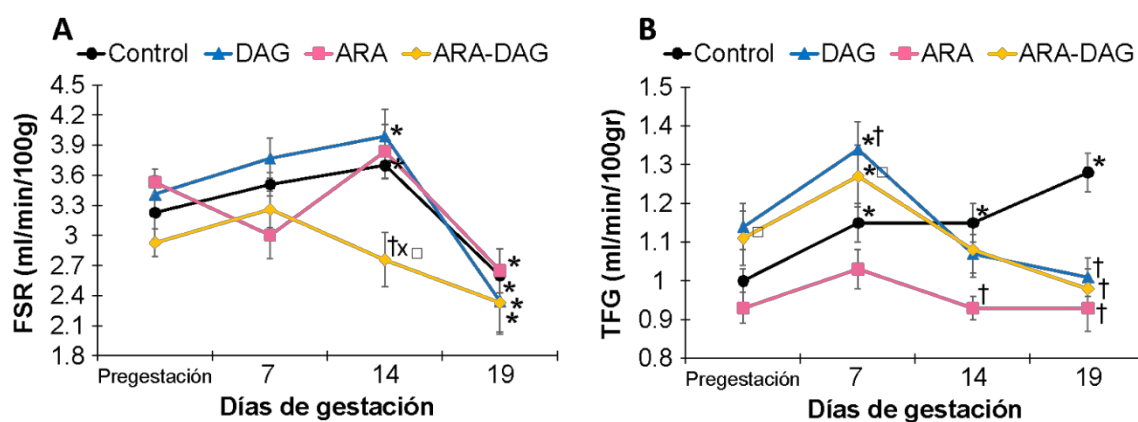
**Figura 20:** cambios de la frecuencia cardíaca (lat./min) (A) y del gasto cardíaco (ml/min/100g) (B) en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. *ARA* (reducido número de nefronas); *DAG* (alta ingesta de grasa); *ARA-DAG* (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

**PAS:** la alta ingesta de grasa en el grupo de ratas con reducido número de nefronas indujo aumentos de la PAS antes de la concepción con respecto al grupo control, que fueron similares a los observados en el resto de los grupos experimentales. Sin embargo, y al contrario de lo que se observó en los demás grupos de animales, este parámetro no disminuyó en respuesta a la gestación (*tabla 4, figura 21*).



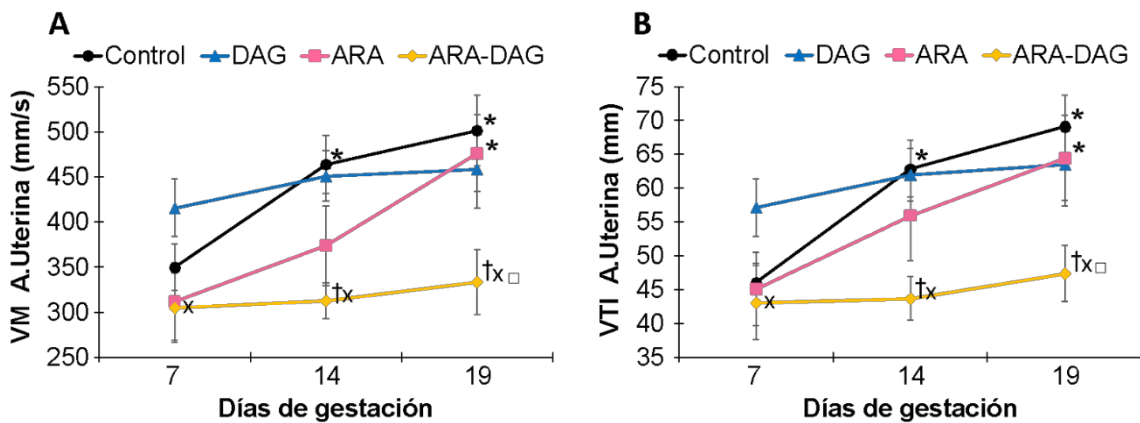
**Figura 21:** cambios de la presión arterial (mmHg) en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. *ARA* (reducido número de nefronas); *DAG* (alta ingesta de grasa); *ARA-DAG* (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

**Hemodinámica renal:** los valores de FSR en el grupo de animales ARA (*tabla 6, figura 22A*) y DAG fueron similares a los del resto de grupos experimentales en el período pregestacional. Posteriormente, este parámetro disminuyó significativamente a mitad de la gestación en este grupo de animales, alcanzando niveles inferiores ( $p < 0.05$ ) a los del grupo control ( $2.76 \pm 0.27$  ml/min/100g vs.  $3.70 \pm 0.14$  ml/min/100g, grupo ARA-DAG vs. grupo control) y a los observados en los demás grupos experimentales ( $3.84 \pm 0.27$  ml/min/100g en el grupo ARA y  $3.99 \pm 0.27$  ml/min/100g en el grupo DAG). Este descenso se mantuvo hasta la última semana de gestación. En cuanto a los cambios en la TFG (*tabla 7, figura 22B*), la alta ingesta de grasa en los animales con reducido número de nefronas indujo aumentos significativos de la TFG en el día 7 de gestación, que fueron similares a los observados en el grupo control. Posteriormente, este parámetro descendió progresivamente hasta el día 19, mostrando valores inferiores ( $p < 0.05$ ) a los del grupo control ( $0.98 \pm 0.05$  ml/min/100g vs.  $1.28 \pm 0.05$  ml/min/100g, grupo ARA-DAG vs. grupo control) pero similares a los observados en el grupo de ratas ARA ( $0.93 \pm 0.06$  ml/min/100g) y en el grupo de ratas DAG ( $1.01 \pm 0.05$  ml/min/100g).



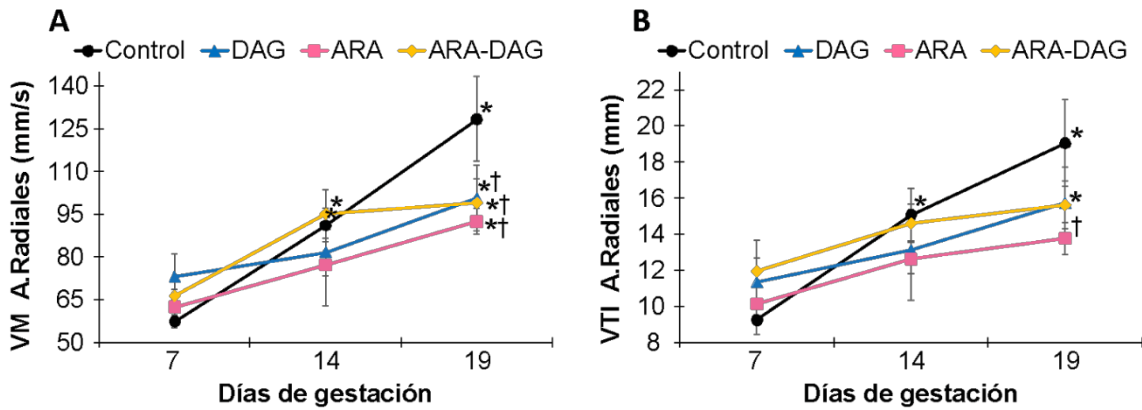
**Figura 22:** cambios del flujo sanguíneo renal (ml/min/100g) (A) y la tasa de filtración glomerular (ml/min/100gr) (B) en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; ‡  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

**Hemodinámica uterina:** la alta ingesta de grasa en los animales con disminución del número de nefronas provocó alteraciones importantes en la respuesta hemodinámica uterina a la gestación. En este grupo de animales, y a diferencia de lo que ocurría en el grupo control, la PSV (*tabla 8*), la EDV (*tabla 9*), la VM (*tabla 10*) y la VTI (*tabla 11*) permanecieron invariables a lo largo de las diferentes etapas gestacionales. Además, los valores de todos estos parámetros fueron inferiores ( $p<0.05$ ) a los del grupo control en los días 14 y 19 de gestación. Como se puede observar en la *figura 23A*, la VM de la arteria uterina de este grupo de animales también fue menor ( $p<0.05$ ) que la observada en el grupo de ratas DAG, tanto en el día 14 ( $313 \pm 20$  mm/s vs.  $451 \pm 28$  mm/s, grupo ARA-DAG vs. grupo DAG) como en el día 19 de gestación ( $333 \pm 36$  mm/s vs.  $459 \pm 43$  mm/s, grupo ARA-DAG vs. grupo DAG) así como en el grupo de ratas ARA al final de la gestación ( $333 \pm 36$  mm/s vs.  $476 \pm 42$  mm/s, ratas ARA-DAG vs. ratas DAG). Del mismo modo, la VTI (*figura 23B*) fue menor ( $p<0.05$ ) que en el grupo de ratas DAG en los días 14 ( $44 \pm 3$  mm vs.  $62 \pm 4$  mm, ratas ARA-DAG vs. ratas DAG) y 19 ( $47 \pm 4$  mm vs.  $64 \pm 6$  mm, ratas ARA-DAG vs. ratas DAG) y que en el grupo de ratas ARA al final de la gestación ( $47 \pm 4$  mm vs.  $65 \pm 6$  mm, ratas ARA-DAG vs. ratas ARA).



**Figura 23:** cambios de la velocidad media (mm/s) (A) y de la velocidad integral en el tiempo (mm/s) (B) de la arteria uterina en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P<0.05$  vs. 7 días; †  $P<0.05$  vs. grupo control; ‡  $P<0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P<0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

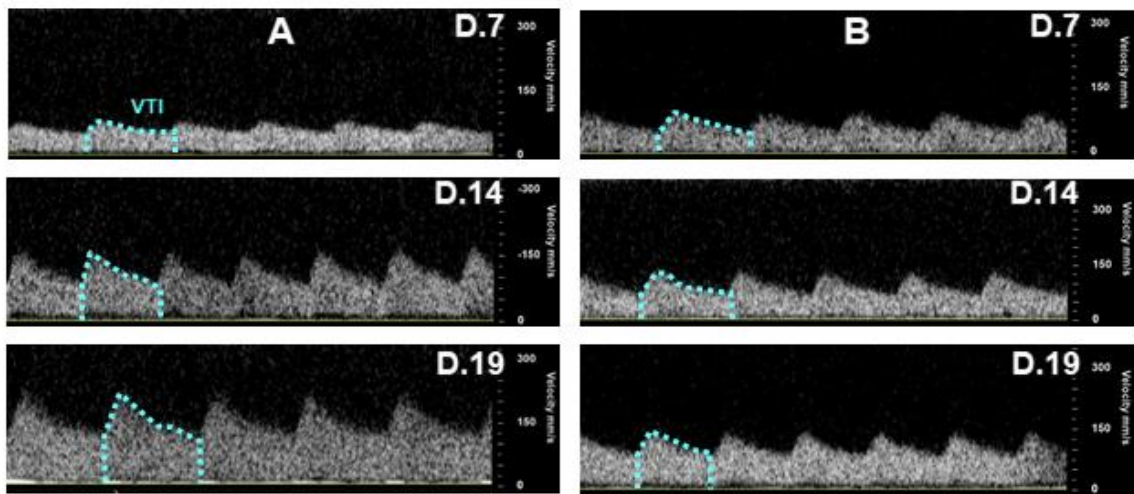
**Arterias radiales:** la PSV (*tabla 12*) y la VM (*tabla 14*) de las arterias radiales en el grupo de ratas ARA-DAG aumentaron gradualmente ( $p < 0.05$ ) desde el día 7 hasta el día 19 de gestación. Sin embargo, los valores de estos parámetros, junto con los de EDV (*tabla 13*) fueron significativamente menores que los observados en el grupo control al final de la gestación. Así, como se puede observar en la *figura 24A*, la VM en las arterias radiales en el día 19 de gestación alcanzó un valor de  $99 \pm 8$  mm/s, mientras que fue de  $128 \pm 15$  mm/s en el grupo control. En cuanto a la VTI (*tabla 15, figura 24B*), a pesar de que no sufrió cambios significativos en este grupo de animales a lo largo de la gestación, mostró valores similares a los del grupo control.



**Figura 24:** cambios de la velocidad media (mm/s) (A) y de la velocidad integral en el tiempo (mm/s) (B) de las arterias radiales en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. 7 días; †  $P < 0.05$  vs. grupo control. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

## Grupo control

## Grupo DAG



**Figura 25:** espectro de velocidades de flujo Doppler obtenido de las arterias radiales de una rata gestante control (A) y otra alimentada con una alta ingesta de grasa desde la etapa perinatal (DAG) (B) en los días 7, 14 y 19 de gestación. Se muestran los cambios en la VTI a lo largo de la gestación.



### 4.3 TABLAS

GC (ml/min/100g)				
Grupos	Días de gestación			
	Pregestación	7	14	19
Control	26.7 ± 1.8	26.7 ± 1.0	25.5 ± 1.5	24.1 ± 1.2
DAG	21.2 ± 1.5†	22.8 ± 1.0†	25.9 ± 1.4*	21.2 ± 1.5
ARA	19.8 ± 1.9†	19.0 ± 1.3†	19.0 ± 1.3†	19.0 ± 1.3†
ARA-DAG	23.3 ± 0.7†	22.0 ± 2.0†	19.5 ± 1.6*†x	20.5 ± 1.0†

**Tabla 1:** cambios del gasto cardíaco (ml/min/100g) en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

VS (µl/100g)				
Grupos	Días de gestación			
	Pregestación	7	14	19
Control	69 ± 4	67 ± 2	65 ± 3	64 ± 3
DAG	60 ± 3	54 ± 2†	69 ± 3	58 ± 5
ARA	53 ± 5†	51 ± 3†	55 ± 4†	51 ± 3†
ARA-DAG	68 ± 4□	60 ± 6	54 ± 5*†x	60 ± 4

**Tabla 2:** cambios del volumen sistólico (µl/100g) en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

FC (lat./min)				
Grupos	Días de gestación			
	Pregestación	7	14	19
Control	365 ± 7	390 ± 7*	390 ± 7*	385 ± 8*
DAG	353 ± 11	393 ± 11*	385 ± 9*	385 ± 9*
ARA	365 ± 10	359 ± 9†	366 ± 6†	396 ± 10*
ARA-DAG	347 ± 13	357 ± 12†x	382 ± 8*	355 ± 10†x□

**Tabla 3:** cambios de la frecuencia cardíaca (lat./min) en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

PAS (mmHg)				
Grupos	Días de gestación			
	Pregestación	7	14	19
Control	110 ± 2	107 ± 3	98 ± 3*	96 ± 3*
DAG	122 ± 2†	121 ± 5†	119 ± 4†	110 ± 3*†
ARA	127 ± 2†	116 ± 2*†	126 ± 4†	116 ± 4*†
ARA-DAG	129 ± 2†	129 ± 13†□	131 ± 6†x	126 ± 5†x

**Tabla 4:** cambios de la presión arterial sistólica (mmHg) en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

Peso (g)				
Grupos	Días de gestación			
	Pregestación	7	14	19
Control	234 ± 5	244 ± 3*	268 ± 3*	295 ± 3*
DAG	264 ± 8†	286 ± 7*†	302 ± 7*†	350 ± 9*†
ARA	244 ± 8	272 ± 3*†	299 ± 4*†	343 ± 8*†
ARA-DAG	270 ± 6†□	298 ± 11*†□	320 ± 9*†x□	361 ± 12†x□

**Tabla 5:** cambios de peso (g) en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

FSR (ml/min/100g)				
Grupos	Días de gestación			
	Pregestación	7	14	19
Control	3.23 ± 0.16	3.51 ± 0.12	3.70 ± 0.14*	2.60 ± 0.27*
DAG	3.41 ± 0.18	3.77 ± 0.20	3.99 ± 0.27*	2.35 ± 0.31*
ARA	3.53 ± 0.13	3.00 ± 0.23	3.84 ± 0.27	2.65 ± 0.22*
ARA-DAG	2.93 ± 0.14	3.26 ± 0.18	2.76 ± 0.27†x□	2.33 ± 0.31*

**Tabla 6:** cambios del flujo sanguíneo renal (ml/min/100g) en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

TFG (ml/min/100g)				
Grupos	Días de gestación			
	Pregestación	7	14	19
Control	1.00 ± 0.03	1.15 ± 0.05*	1.15 ± 0.05*	1.28 ± 0.05*
DAG	1.14 ± 0.06	1.34 ± 0.07*†	1.07 ± 0.05	1.01 ± 0.05†
ARA	0.93 ± 0.04	1.03 ± 0.05	0.93 ± 0.03†	0.93 ± 0.06†
ARA-DAG	1.11 ± 0.07□	1.27 ± 0.09*□	1.08 ± 0.08	0.98 ± 0.05†

**Tabla 7:** cambios de la tasa de filtración glomerular (ml/min/100g) en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. pregestación; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

PSV arteria uterina (mm/s)			
Grupos	Días de gestación		
	7	14	19
Control	506 ± 37	645 ± 41*	701 ± 59*
DAG	575 ± 62	645 ± 39	677 ± 71
ARA	464 ± 60	546 ± 68	702 ± 65*
ARA-DAG	458 ± 54	479 ± 29†x	495 ± 52†x□

**Tabla 8:** cambios de la velocidad sistólica máxima (mm/s) de la arteria uterina en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. 7 días; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

EDV arteria uterina (mm/s)			
Grupos	Días de gestación		
	7	14	19
Control	186 ± 15	268 ± 18*	306 ± 22*
DAG	197 ± 22	242 ± 18	245 ± 20*†
ARA	174 ± 29	210 ± 22	251 ± 22*
ARA-DAG	167 ± 23	164 ± 11†x	175 ± 20†x□

**Tabla 9:** cambios de la velocidad diastólica final (mm/s) de la arteria uterina en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. 7 días; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

VM arteria uterina (mm/s)			
Grupos	Días de gestación		
	7	14	19
Control	350 ± 26	464 ± 32*	502 ± 39*
DAG	416 ± 32	451 ± 28	459 ± 43
ARA	312 ± 43	374 ± 44	476 ± 42*
ARA-DAG	305 ± 39x	313 ± 20†x	333 ± 36†x□

**Tabla 10:** cambios de la velocidad media (mm/s) de la arteria uterina en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. 7 días; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

VTI arteria uterina (mm)			
Grupos	Días de gestación		
	7	14	19
Control	46 ± 3	63 ± 4*	69 ± 5*
DAG	57 ± 4	62 ± 4	64 ± 6
ARA	45 ± 5	56 ± 7	65 ± 6*
ARA-DAG	43 ± 5 <sub>x</sub>	44 ± 3 <sub>†x</sub>	47 ± 4 <sub>†x□</sub>

**Tabla 11:** cambios de la velocidad integral en el tiempo (mm) de la arteria uterina en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. 7 días; †  $P < 0.05$  vs. grupo control; □  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. ARA; x  $P < 0.05$  ARA-DAG vs. DAG. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

PSV arterias radiales (mm/s)			
Grupos	Días de gestación		
	7	14	19
Control	75 ± 2	121 ± 8*	178 ± 19*
DAG	96 ± 10	110 ± 12	141 ± 16*
ARA	85 ± 8	108 ± 22	134 ± 6*†
ARA-DAG	90 ± 6	130 ± 11*	140 ± 12*†

**Tabla 12:** cambios de la velocidad sistólica máxima (mm/s) de las arterias radiales en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. 7 días; †  $P < 0.05$  vs. grupo control. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

EDV arterias radiales (mm/s)			
Grupos	Días de gestación		
	7	14	19
Control	43 ± 2	64 ± 4*	85 ± 13*
DAG	52 ± 5	59 ± 6	65 ± 8†
ARA	45 ± 5	49 ± 7	58 ± 5†
ARA-DAG	49 ± 4	62 ± 6	66 ± 6†

**Tabla 13:** cambios de la velocidad diastólica final (mm/s) de las arterias radiales en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. 7 días; †  $P < 0.05$  vs. grupo control. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

VM arterias radiales (mm/s)			
Grupos	Días de gestación		
	7	14	19
Control	58 ± 2	91 ± 6*	128 ± 15*
DAG	73 ± 8	82 ± 8	101 ± 12*†
ARA	63 ± 6	77 ± 14	93 ± 5*†
ARA-DAG	66 ± 5	95 ± 9*	99 ± 8*†

**Tabla 14:** cambios de la velocidad media (mm/s) de las arterias radiales en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación \*  $P < 0.05$  vs. 7 días; †  $P < 0.05$  vs. grupo control. ARA (reducido número de nefronas); DAG (alta ingesta de grasa); ARA-DAG (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

<b>VTI arterias radiales (mm)</b>			
<b>Grupos</b>	<b>Días de gestación</b>		
	<b>7</b>	<b>14</b>	<b>19</b>
<b>Control</b>	9 ± 1	15 ± 2*	19 ± 2*
<b>DAG</b>	11 ± 1	13 ± 1	16 ± 2*
<b>ARA</b>	10 ± 1	13 ± 2	14 ± 1†
<b>ARA-DAG</b>	12 ± 2	15 ± 1	16 ± 1

**Tabla 15:** cambios de la velocidad integral en el tiempo (mm) de las arterias radiales en los diferentes grupos experimentales a lo largo de la gestación. \*  $P < 0.05$  vs. 7 días; †  $P < 0.05$  vs. grupo control. *ARA* (reducido número de nefronas); *DAG* (alta ingesta de grasa); *ARA-DAG* (reducido número de nefronas con alta ingesta de grasa).

<b>Triángulo mesometrial arterias espirales</b>			
<b>Grupos</b>	<b>%TE</b>	<b>%F</b>	<b>%MLV</b>
<b>Control</b>	59 ± 5	42 ± 7	16 ± 5
<b>SnMP</b>	21 ± 3*	22 ± 3*	33 ± 5*

**Tabla 16:** trofoblasto endovascular (TE), fibrinoide (F) y músculo liso vascular (MLV) en las arterias espirales de todo el triángulo mesometrial de ratas gestantes control y ratas gestantes tratadas con SnMP, expresado como % de la longitud total del contorno de la arteria espiral.  $P < 0.05$  vs. grupo control.



VM y VTI arterias uterina y radiales								
Grupos	Arteria uterina				Arterias radiales			
	VM (mm/s)		VTI (mm)		VM (mm/s)		VTI (mm)	
	Día 14	Día 19	Día 14	Día 19	Día 14	Día 19	Día 14	Día 19
<b>Control</b>	414 ± 19	573 ± 49*	64 ± 5	86 ± 8*	100 ± 9	164 ± 12*	17 ± 2	26 ± 2*
<b>SnMP</b>	479 ± 21	487 ± 20	73 ± 4	70 ± 1	108 ± 10	112 ± 8†	17 ± 1	17 ± 1†

**Tabla 17:** velocidad media (mm/s) y velocidad integral en el tiempo (mm) obtenidas de la arteria uterina y de las arterias radiales de ratas gestantes control y tratadas con SnMP los días 14 y 19 de gestación.  $P < 0.05$  vs. día 14; †  $P < 0.05$  vs. ratas gestantes control.



# DISCUSIÓN



## 5 DISCUSIÓN

La gestación es un estado fisiológico dinámico y complejo caracterizado por notables cambios hemodinámicos en la circulación materna, que facilitan un adecuado aporte de oxígeno y nutrientes al feto en desarrollo sin provocar alteraciones en el funcionamiento del organismo materno. Estos cambios adaptativos incluyen aumentos importantes del GC y volumen sanguíneo, así como descensos en las resistencias vasculares y la PA. La circulación uterina y la circulación renal contribuyen significativamente a estas adaptaciones, de modo que estos lechos vasculares sufren dilatación y un marcado incremento en su flujo sanguíneo desde etapas muy tempranas de la gestación. El estudio del patrón que siguen estos cambios a lo largo del embarazo, así como, un mejor conocimiento de los mecanismos que subyacen a estas marcadas adaptaciones del organismo materno son esenciales para identificar la aparición de posibles alteraciones, que detectándose en etapas tempranas permitirían llevar a cabo un adecuado manejo de la gestación y una intervención efectiva sobre la madre gestante.

Numerosos estudios han analizado la respuesta hemodinámica a la gestación en mujeres, pero la mayoría de ellos han utilizado técnicas invasivas, que no son adecuadas para llevar a cabo estudios a largo plazo, además de ser muy cuestionadas por condicionar los resultados. En los últimos años la aparición de la ecografía Doppler ha supuesto un gran avance en la metodología utilizada para los estudios en mujeres gestantes, ya que es una técnica no invasiva, sin riesgo de radiación, y que permite evaluar los cambios hemodinámicos en diferentes órganos a lo largo del embarazo (Armstrong et al., 2011). A pesar de ello, la escasez de estudios longitudinales, el pequeño tamaño de la muestra en la mayoría de ellos, y la dificultad añadida que suponen los diseños experimentales en las mujeres embarazadas, limitan la interpretación de los datos que aparecen en la literatura, y ponen en evidencia la necesidad de incluir modelos animales en este tipo de investigaciones.

La rata grávida es un modelo muy usado para estudiar muchos de los aspectos de la gestación, pero del mismo modo que los estudios llevados a cabo en mujeres, la mayoría de los trabajos de investigación que han analizado los cambios hemodinámicos a lo largo de la gestación en estos animales, han utilizado técnicas invasivas y/o se han centrado en una etapa gestacional aislada o en un lecho vascular concreto. Por ello, el

primero de los objetivos planteado en la presente tesis doctoral fue evaluar la hemodinámica cardíaca, renal y uterina, y determinar los cambios de PAS a lo largo de la gestación en ratas, empleando técnicas no invasivas. Esta metodología ha permitido llevar a cabo un seguimiento simultáneo de todos estos parámetros en cada una de las etapas gestacionales y, además, en el mismo sujeto de estudio.

Los resultados obtenidos a partir de los protocolos experimentales diseñados para cumplir el primer objetivo indican que la rata grávida responde a la gestación de manera similar a la mujer gestante, mostrando una vasodilatación significativa en las circulaciones renal y uteroplacentaria que está asociada a cambios paralelos en el GC junto con marcados descensos de la PA en la última etapa gestacional.

Los resultados obtenidos en el grupo de ratas control muestran que los valores de GC, corregidos con respecto al peso de los animales, se mantuvieron constantes en las diferentes etapas gestacionales, lo que indica que los cambios de este parámetro fueron suficientes para compensar el incremento progresivo de peso a lo largo de la gestación. Resultados similares han sido descritos por Wong et al. (2002) en ratones. Estos autores demostraron que a pesar de que las hembras gestantes presentaban aumentos significativos en los valores absolutos de GC al final de la gestación, estos no se apreciaban cuando este parámetro se expresaba por unidad de peso corporal. En el mismo sentido, Gilson et al. (1992) mostraron que los incrementos de GC observados al final de la gestación en ratas gestantes, fueron menores cuando se consideraba el peso de los animales. Por tanto, estos resultados indican que los mayores niveles de GC en la rata grávida se producen al final de la gestación y parecen estar estrechamente relacionados con los marcados aumentos de peso que se producen en esta etapa, y que están asociados entre otros factores al desarrollo de la unidad uteroplacentaria, al crecimiento fetal y al aumento creciente del volumen sanguíneo. Una relación similar del GC con el peso materno ha sido también demostrada en mujeres gestantes (Mone et al., 1996; Vinayagam et al., 2017). En el embarazo, los cambios en el GC se observan desde las primeras semanas y alcanzan un pico a mitad de la gestación, coincidiendo con el remodelado de las arteriolas espirales endometriales. En la rata gestante este proceso se produce durante la última etapa gestacional, lo que sugiere que las mayores adaptaciones cardiovasculares a la gestación en este modelo animal se producen relativamente más tarde que en las mujeres embarazadas.

Los aumentos en los valores absolutos del GC que también observamos en el presente estudio estuvieron asociados tanto a cambios del VS como a incrementos de la FC a lo largo de la gestación, coincidiendo con los resultados de diversos trabajos de investigación previos realizados en ratas y ratones gestantes (Kulandavelu et al., 2006; Slangen et al., 1996). Del mismo modo que ocurría con el GC, los aumentos significativos del VS al final de la gestación no se observaron cuando los valores de este parámetro se corrigieron por el peso corporal de los animales, lo que sugiere una cierta influencia del mismo sobre los cambios gestacionales del VS. Esta idea está apoyada por los resultados obtenidos en varios estudios realizados en mujeres, en diferentes etapas gestacionales, que demuestran que el peso es un factor determinante en las variaciones del VS durante el embarazo (Mone et al., 1996; Vinayagam et al., 2017). A pesar de que los mecanismos que subyacen a los cambios en el VS, y por tanto en el GC, no han sido analizados en este estudio, la expansión del volumen plasmático, una disminución de las resistencias periféricas, el aumento de la contractilidad y el remodelado cardíaco (Chung y Leinwand, 2014; Kulandavelu et al., 2006; Melchiorre et al., 2012) son factores que podrían estar contribuyendo a las adaptaciones cardiovasculares descritas. Una expansión del volumen plasmático secundaria a la marcada vasodilatación sistémica característica de la gestación se ha descrito tanto en mujeres como en ratas gestantes (Baylis, 1994; Gyselaers et al., 2018; Verkeste et al., 1998). Sin embargo, la disminución de las resistencias periféricas se produce a distintos tiempos en la mujer embarazada y en la rata grávida (Gilson et al., 1992; Hill y Pickinpaugh, 2008). Así, mientras que las mayores disminuciones de la PA ocurren al final del segundo trimestre en las mujeres embarazadas (Hill y Pickinpaugh, 2008), la disminución significativa de este parámetro en nuestro estudio tuvo lugar al final de la gestación a pesar de los incrementos del GC que se produjeron en esta etapa.

Paralelamente a los cambios en el GC, en nuestro estudio, se observó una marcada vasodilatación renal al final de la segunda semana de gestación. El FSR y la TFG aumentaron significativamente en el día 14 de gestación con respecto al periodo previo a la concepción. Sin embargo, mientras que el FSR disminuyó posteriormente, la TFG continuó aumentando hasta el final de la gestación. El efecto del proceso gestacional sobre la RVS y la TFG es bastante consistente en los diferentes modelos animales que se han estudiado, mientras que los cambios en el FSR presentan una mayor variabilidad (van Drongelen et al., 2014). Entre las causas de esta heterogeneidad se encuentran el limitado número de estudios longitudinales que han determinado este parámetro a lo largo de la

gestación, la variabilidad de la metodología, así como, las diferentes especies estudiadas. En este sentido, el uso de la ultrasonografía Doppler en el presente trabajo de investigación ha permitido analizar de manera no invasiva la hemodinámica renal en la rata, al final de cada una de las semanas de gestación, utilizando la etapa previa a la concepción como periodo control en el mismo animal. Los resultados obtenidos son similares a los que se observan en mujeres embarazadas, en las cuales el FSR y la TFG se comportan también de forma diferente según avanza la gestación. Así, mientras que el FSR aumenta de forma significativa durante la primera mitad del embarazo y desciende posteriormente a niveles similares a los de antes de la concepción, la TFG muestra un patrón similar en la primera parte de la gestación, pero continúa elevada hasta el final de la misma (Hussein y Lafayette, 2014). Aplicando la técnica de micropunción renal en ratas gestantes en mitad de la gestación, etapa donde el FSR es máximo, Baylis (1980) demostró que el aumento gestacional de la TFG en una nefrona aislada se debe principalmente al aumento en el flujo plasmático glomerular. Esta autora concluyó que el aumento del flujo plasmático glomerular provoca un aumento en la presión de ultrafiltración secundario a la disminución de la presión oncótica a lo largo de los capilares glomerulares y subsecuentemente un aumento de la TFG en la nefrona aislada. En este estudio, la presión oncótica plasmática no fue diferente entre las ratas gestantes y las ratas control. Esta relación entre los aumentos de FSR y TFG en la primera mitad de la gestación ha sido también demostrada en un estudio realizado en mujeres en etapas tempranas del embarazo (Roberts et al., 1996). Sin embargo, como ya se ha señalado anteriormente, la relación entre ambos parámetros cambia en nuestro estudio según avanza la gestación, al igual que se ha observado en mujeres embarazadas (Hussein y Lafayette, 2014). Los aumentos de la TFG, a pesar de la disminución en el FSR que se observa en la última etapa gestacional, se podrían explicar por la importante reducción de la presión oncótica provocada por la hemodilución de las proteínas plasmáticas secundaria al marcado aumento del volumen plasmático que ocurre al final del embarazo (Hussein y Lafayette, 2014). Una mayor contribución del coeficiente de ultrafiltración glomerular ( $K_f$ ) a la regulación de la TFG durante la última etapa de la gestación podría también explicar estos resultados. Debido a que ni la presión oncótica glomerular ni la  $K_f$  pueden medirse directamente en humanos, varios autores han hecho una estimación de estos parámetros utilizando un modelo matemático basado en los coeficientes de filtrado de dextrano neutro en mujeres, al final de la gestación (Milne et al., 2002; Roberts et al., 1996). Estos autores concluyeron que la elevada TFG en mujeres en el tercer trimestre de



gestación, se debe a una combinación de los niveles de FSR, una disminución de la presión oncótica y un aumento de la Kf. La contribución de la Kf a los cambios de la TFG en la última etapa del embarazo también se ha sugerido en un estudio en mujeres en el que se observó, que mientras que a las dos semanas después del parto el flujo plasmático renal fue similar al periodo previo a la concepción y la presión oncótica aumentó por encima de los valores basales, estas mujeres mostraron una elevada TFG asociada a aumentos significativos de la Kf y de la presión hidrostática capilar renal. Por tanto, todos estos resultados apuntan hacia la idea de que la hiperfiltración gestacional en la rata y en la mujer gestante en la última etapa gestacional no depende exclusivamente del FSR (Odutayo y Hladunewich, 2012).

Todos estos resultados en conjunto ponen de manifiesto que la vasodilatación del lecho vascular renal es uno de los primeros cambios adaptativos que se producen en respuesta a la gestación y tanto en la mujer embarazada como en la rata gestante, precede a los máximos cambios en la función cardiovascular a pesar de que estos tienen lugar en momentos del embarazo relativamente diferentes en ambas especies.

Del mismo modo que el lecho vascular renal, la circulación uteroplacentaria ejerce un papel crítico en las adaptaciones hemodinámicas a la gestación, pues contribuye también de manera primordial a la disminución de las resistencias periféricas y a los descensos de la PA característicos de este proceso. Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que los parámetros hemodinámicos medidos por ultrasonografía Doppler en la arteria uterina y en las arterias radiales de las ratas gestantes mostraron incrementos graduales desde el día 7 hasta el final del embarazo, sugiriendo que la vasculatura uteroplacentaria sufre una importante vasodilatación y un aumento de flujo sanguíneo, que es evidente desde el final de la segunda semana de gestación y que se produce en paralelo a los cambios observados en el GC. Existen estudios previos en los cuales se ha encontrado un aumento progresivo de la PSV y de la EDV durante la gestación en las arterias uterinas de ratas y ratones gestantes (Bibeau et al., 2016), lo que indica una relación directa entre estos parámetros y el gradual incremento del flujo sanguíneo en la unidad uteroplacentaria característico del embarazo. Estos hallazgos son consistentes con un estudio reciente que muestra que la ligadura de los vasos uterinos en ratones causa una disminución significativa de la PSV de la arteria uterina medida por ecografía Doppler (Bibeau et al., 2016). En la mujer gestante se ha demostrado que la PSV y la EDV muestran un marcado ascenso desde el inicio del embarazo, que está

fuertemente correlacionado con la duración de la gestación, lo que indica un cambio de elasticidad y resistencia en la circulación uterina desde las primeras semanas de gestación (Abd El Aal y Künzel, 1994). Estos autores demostraron que el cálculo de los índices de resistencia en este estudio no aportaba información sobre los cambios en la resistencia del lecho vascular uterino, puesto que tanto la PSV como la EDV aumentaron simultáneamente. Por otro lado, la VM en la arteria uterina también se ha correlacionado con la edad gestacional en la mujer embarazada, lo que demuestra que este parámetro puede ser un buen indicador de la perfusión vascular uterina (Bower et al., 1992).

En la rata, los trofoblastos penetran en la decidua uterina entre el día 14 y 15 de gestación, y ocupan el miometrio a medida que avanza la gestación. El remodelado vascular del triángulo mesometrial es máximo en el día 18 de gestación y está asociado con la destrucción de la capa de células musculares lisas de las arterias espirales (Ain et al., 2003). La cronología de este proceso en la rata sugiere que los incrementos máximos observados en los parámetros hemodinámicos medidos en la arteria uterina y en las arterias radiales al final de la gestación en nuestro estudio, se podrían explicar parcialmente por la mayor disminución de las resistencias uteroplacentarias provocada por el fin del proceso de remodelado de las arteriolas espirales. En las mujeres gestantes el incremento del FSU es detectable desde el primer trimestre de gestación. Este parámetro muestra aumentos graduales y moderados hasta la semana 10-12 y rápidos incrementos durante el segundo trimestre que se mantienen hasta el final del embarazo (Osol y Moore, 2014). Por tanto, al igual que ocurre en la rata gestante los mayores incrementos en el FSU en el embarazo humano se observan después de que se haya completado el proceso de remodelado de las arterias espirales maternas, que en el embarazo humano comienza en las primeras semanas de gestación y finaliza alrededor de la semana 20. A pesar de ello, los incrementos en el FSU en el embarazo humano son evidentes desde antes de la invasión trofoblástica de las arterias espirales, de manera que otros mecanismos parecen estar influyendo en la disminución temprana de las resistencias vasculares uteroplacentarias. En este sentido, el aumento en el diámetro de la arteria uterina y la formación de anastomosis arteriovenosas en la circulación uterina se han propuesto como los principales factores que podrían explicar la vasodilatación en este lecho vascular en el primer trimestre de embarazo (Osol y Moore, 2014). Estas anastomosis, que se han descrito en mujeres gestantes (Gyselaers y Peeters, 2013) conectan las arterias radiales miometriales con el lado venoso de la vasculatura y pueden

contribuir a la regulación de la resistencia vascular uterina desde las primeras etapas de la gestación.

En resumen, los resultados obtenidos con los experimentos realizados para cumplir el primer objetivo de la presente tesis doctoral, indican que la rata gestante muestra cambios graduales en el GC a lo largo de la gestación, que están asociados a aumentos significativos en el flujo de sangre en los lechos vasculares renal y uteroplacentario, y que están relacionados directamente con el incremento gradual de peso característico del embarazo. La máxima vasodilatación en la circulación uteroplacentaria se observa al final de la gestación, coincidiendo con los mayores incrementos en el GC y los menores niveles de PA. Sin embargo, los aumentos en el FSR son más evidentes al final de la segunda semana y preceden a los máximos cambios en la función cardiovascular que se observan al final del embarazo. Estos resultados sugieren que una proporción importante del GC en la última etapa gestacional se dirige hacia la circulación uteroplacentaria, priorizando las exigentes demandas del feto en desarrollo, a expensas de una disminución en el aporte de sangre a otros órganos, que, como el riñón, vuelven en esta etapa a un estado similar a la etapa previa a la concepción.

En los últimos años se ha demostrado que el sistema hemooxigenasa-monóxido de carbono (HO-CO) está implicado en los procesos de adaptación hemodinámica del organismo materno al embarazo. En este sentido, diferentes trabajos de investigación en animales han demostrado un papel importante de este sistema en la regulación de la función uteroplacentaria y de la PA durante la gestación. Sin embargo, hasta el momento no se había determinado si la contribución del sistema HO-CO a la regulación de la PA durante la gestación podría estar mediada por sus posibles acciones sobre el remodelado de las arterias espirales, influyendo así en la respuesta hemodinámica uteroplacentaria. Por tanto, el segundo de los objetivos de la presente tesis doctoral fue determinar los cambios en los parámetros hemodinámicos en las arterias uterina y radial a lo largo de la gestación en ratas con posibles alteraciones en el remodelado de las arterias espirales y aumentos de la presión arterial inducidos por una disminución de la actividad del sistema HO-CO.

Los resultados obtenidos a partir de los grupos experimentales diseñados para cumplir este objetivo muestran en primer lugar, que ambas isoformas de la HO se expresan en los sitios de implantación en la rata gestante. Concretamente, los niveles más

altos de expresión de HO-1 y HO-2 se observaron a mitad de la gestación, coincidiendo con el inicio de la invasión trofoblástica de la decidua uterina de la rata (Ain et al., 2003), y sugiriendo así, que la HO puede estar involucrada en este proceso y, por lo tanto, en la remodelación vascular materna inducida por estas células. En un estudio previo se ha observado un patrón gestacional similar de expresión de ambas isoformas de la HO (Kreiser et al., 2003). Aunque los días de gestación analizados fueron diferentes, estos autores encontraron que los niveles de proteína HO-1 y HO-2 uterina y placentaria, y su ARNm alcanzaron un pico alrededor del día 16 del embarazo, coincidiendo también con las primeras etapas de la invasión trofoblástica uterina (Kreiser et al., 2003).

En el lecho placentario humano, los citotrofbastos endovasculares e intersticiales expresan HO-1 y HO-2, lo que sugiere que la actividad de ambas isoformas de HO podría contribuir también al control de la invasión trofoblástica y, por tanto, de la función placentaria. Con respecto a esta idea, se ha demostrado que la inhibición de la actividad de la HO en la placenta humana provoca una importante constricción en la vasculatura placentaria, demostrando así, la implicación del sistema HO-CO en la regulación del flujo sanguíneo en este órgano (Lyll et al., 2000). Sin embargo, no se conoce la contribución de este sistema al proceso de remodelado de las arterias espirales en mujeres gestantes. La presente tesis doctoral ha evaluado el remodelado vascular dependiente de los trofbastos en el triángulo mesometrial de ratas gestantes tratadas con un inhibidor de la actividad de la HO, SnMP. Al igual que en los seres humanos, las ratas gestantes presentan una placenta hemocorial, que se caracteriza por una invasión trofoblástica intrauterina profunda y una remodelación de las arterias espirales secundaria a esta invasión (Ain et al., 2003; Carter et al., 2006).

En la rata, los trofbastos penetran en la decidua uterina entre los días 14 y 15 de gestación y se extienden hacia el miometrio a medida que avanza la gestación (Ain et al., 2003). La invasión vascular del triángulo mesometrial es máxima a los 18 días de gestación y se asocia con una pérdida de la capa de músculo liso en los vasos invadidos (Ain et al., 2003). En el presente estudio, el inhibidor de la HO se administró el día 14, coincidiendo con el inicio de esta invasión y, posteriormente (día 19 de gestación) se evaluó el remodelado de las arterias espirales en el triángulo mesometrial. Los estudios inmunohistoquímicos mostraron que la administración del inhibidor de la HO provocó alteraciones en la transformación vascular de las arterias uterinas en las ratas grávidas. En el día 19 de gestación, estas arterias mostraron una menor proporción de trofbastos

recubriendo su contorno interno, y una mayor cantidad de músculo liso que las arterias de ratas preñadas control, lo que sugiere que la enzima HO está implicada en los cambios estructurales que se producen en la vasculatura mesometrial uterina durante la última etapa de la gestación. La presencia de una mayor proporción de músculo liso vascular en las arterias espirales de ratas con actividad reducida de la HO, puede provocar una mayor resistencia al flujo sanguíneo en estos vasos y, subsecuentemente una disminución en el aporte de sangre a la placenta y a la circulación fetal. Este es el primer estudio que muestra que el sistema HO-CO está involucrado en el remodelado de las arterias espirales inducido por los trofoblastos al final de la gestación. A pesar de que en un estudio previo en ratones hembra con deficiencia en HO-1, se había observado que la relación entre el diámetro de la pared y el lumen de las arterias espirales aumenta con la gestación en comparación con los controles, este estudio fue realizado durante las primeras etapas gestacionales y no incluye datos que cuantifiquen la invasión trofoblástica (Linke et al., 2014). En el ratón hembra este proceso también se inicia a mitad de la gestación, pero a diferencia de la rata, la invasión se limita a la decidua mesometrial uterina y su contribución al remodelado endovascular es menor. Por esa razón, a pesar de que la invasión trofoblástica profunda en el embarazo humano ocurre relativamente antes que en la rata, este modelo animal se considera más adecuado que el ratón para los estudios de remodelación de los vasos uterinos durante la gestación. En nuestro estudio, el inadecuado remodelado de las arterias espirales maternas estuvo asociado a importantes alteraciones en la hemodinámica uterina, una mayor reabsorción fetal y niveles más altos de PA al final de la gestación. Estos resultados sugieren que el incremento de la PA, inducido por la reducción de la actividad de la HO en ratas preñadas, puede ser una consecuencia de un aumento en la resistencia de la vasculatura uterina y una reducción en el flujo de sangre en la circulación uteroplacentaria. En este sentido, se ha demostrado que la reducción mecánica de la presión de perfusión uterina provoca HTA en ratas preñadas (Llinás et al., 2004) y en ratones (Fushima et al., 2016), que no se observa en animales no gestantes. Aunque en nuestro estudio el aumento de la PA observado al final de la gestación en respuesta a la inhibición de la HO no es excesivo, los resultados sugieren un deterioro considerable de la adaptación vascular a la gestación, puesto que las ratas preñadas control muestran niveles de PAM alrededor de 14 mm Hg inferiores que los observados en las ratas preñadas tratadas con el inhibidor. Finalmente, estos resultados también son consistentes con estudios que muestran que las alteraciones del

flujo sanguíneo de la arteria uterina están presentes en mujeres con HTA gestacional y PE (Pijnenborg et al., 2011).

En nuestro estudio los parámetros hemodinámicos medidos mediante ultrasonografía Doppler en la arteria uterina y en las arterias radiales, PSV, EDV, VM y VTI, aumentaron al final del embarazo en las ratas preñadas control. Sin embargo, estos parámetros no cambiaron en los vasos uterinos de ratas con actividad de HO disminuida. Por tanto, en estos animales la alteración del remodelado de las arterias espirales dependiente de los trofoblastos estuvo asociado a disminuciones importantes en los parámetros Doppler tanto en la arteria uterina como en las arterias radiales. Tomados en conjunto, estos datos indicarían que una actividad disminuida de la HO puede conducir a una reducción del flujo sanguíneo uteroplacentario y a un deficiente aporte de sangre a la circulación fetal. Aunque la contribución del sistema HO a la adaptación de la circulación uteroplacentaria al embarazo es clara en nuestro estudio, se desconoce el mecanismo subyacente a este efecto. De acuerdo con nuestros resultados, varios estudios han demostrado que una invasión trofoblástica defectuosa está asociada con alteraciones en los parámetros Doppler de la arteria uterina (Craven et al., 1998; Geusens et al., 2008; Lyall et al., 2013; Prefumo et al., 2004). Sin embargo, las formas de la onda Doppler de las arterias uterinas de los embarazos abdominales muestran cambios similares durante la gestación a los observados en los embarazos intrauterinos, a pesar de que en esta situación no existe invasión de las arterias espirales por los trofoblastos (Acácio, 2002; Collins et al., 2011). Además, el remodelado de las arterias uterinas y radiales no depende de estas células. Por tanto, parece que los cambios en la resistencia de las arterias espirales no son el único determinante en la forma de la onda Doppler de la arteria uterina (Burton et al., 2009). Nuestra hipótesis es que el sistema HO puede estar también involucrado en los cambios estructurales y funcionales observados en las arterias uterinas y radiales durante el embarazo. Durante la gestación, estos vasos experimentan un aumento de tamaño y crecimiento axial, que son independientes de los trofoblastos, y probablemente están mediados por la hipertrofia e hiperplasia de las células endoteliales y de las células musculares lisas (Osol y Mandala, 2009). El sistema HO podría contribuir a estos cambios estructurales a través de sus acciones reguladoras de los niveles de VEGF, dado que este factor induce vasodilatación, estimula la mitosis endotelial y se ha asociado con hipervascularización y agrandamiento vascular (Osol y Mandala, 2009). Esta hipótesis está respaldada por el estudio de George et al. (2013), que ha demostrado que el aumento

de la PA inducido por la administración de SnMP durante la última etapa de la gestación está asociado a una reducción significativa del VEGF, lo que sugiere que niveles más bajos de este factor proangiogénico podrían estar contribuyendo a las alteraciones en la remodelación de las arterias uterinas y radiales, y la vasoconstricción uterina inducida por inhibición de la actividad de la HO. De acuerdo con estos resultados, también se ha demostrado que la inducción de HO-1 atenúa la HTA y la disminución de los niveles de VEGF inducida por la isquemia placentaria, lo que sugiere que la disfunción del endotelio vascular secundaria a la disminución de la presión de perfusión uterina podría mejorar en respuesta a un inductor de esta isoforma (George et al., 2011). Finalmente, los niveles disminuidos de CO en respuesta a la actividad reducida de la HO también pueden contribuir directamente a la reducción del FSU observado en nuestro estudio. Por otro lado, la disminución del FSU inducida por la inhibición de la actividad de la HO, podría estar a su vez mediando parcialmente las alteraciones en el remodelado de las arterias espirales. Con respecto a esta idea, se ha sugerido que el acondicionamiento previo de las arterias espirales precede a la invasión trofoblástica endovascular (Zenclussen et al., 2003), ya que incluso se ha observado que algunos vasos maternos experimentan cambios morfológicos sin interacción con estas células (Whitley y Cartwright, 2010). Lyall et al. (2000) demostraron que la expresión de HO-2 está reducida en las células endoteliales placentarias de mujeres que presentan trastornos del embarazo como la PE o la CIR, lo que sugiere que una reducción en los niveles de CO en estas células podría alterar la dilatación de la arteria espiral antes de la invasión por los trofoblastos. Una posible explicación sería que un FSU reducido y el “shear stress” podrían influir negativamente en las interacciones entre las células del músculo liso vascular y endotelial necesarias para el proceso de remodelación de las arterias espirales (Whitley y Cartwright, 2010). De acuerdo con esta hipótesis se ha demostrado que los embarazos humanos con un patrón de flujo de la arteria uterina de baja resistencia obtenido por ecografía Doppler se asocian con una invasión trofoblástica de los vasos deciduales más extensa que los embarazos con un patrón de flujo de alta resistencia (Prefumo et al., 2004).

En resumen, los datos obtenidos a partir de los experimentos diseñados para cumplir el segundo de los objetivos de la presente tesis doctoral indican que la disminución de la actividad de la HO durante la gestación provoca aumentos de PA y alteraciones en el remodelado de las arterias espirales, que están asociadas a alteraciones significativas en las velocidades de flujo obtenidas a partir de la onda Doppler en la arteria

uterina y las arterias radiales. A pesar ello, no se puede descartar que otros procesos independientes de la invasión trofoblástica de las arterias espirales puedan estar contribuyendo a estas alteraciones de los parámetros hemodinámicos que se observan en las arterias uteroplacentarias. En ese sentido, la inhibición de la actividad de HO durante la última etapa de la gestación podría inducir una reducción en el flujo sanguíneo en las arterias uterinas y radiales, que podría estar contribuyendo en parte a las alteraciones del remodelado de las arterias espirales dependiente de la invasión trofoblástica. Los resultados también sugieren que una mayor resistencia en la circulación uterina durante las últimas etapas de la gestación, puede ser una posible causa de los elevados niveles de PA secundarios a la inhibición de la actividad de la HO.

A pesar de que la mayoría de mujeres se adaptan normalmente al embarazo, gran parte de las complicaciones que aparecen en las etapas finales del mismo están a menudo precedidas por una alteración temprana en los procesos de adaptación gestacionales. Así, entender los mecanismos que subyacen a estas alteraciones es esencial para detectar en etapas tempranas de la gestación, la posible aparición de complicaciones tardías que deriven en condiciones de alto riesgo para la madre y el feto. En este sentido, la obesidad materna e incluso el sobrepeso son importantes factores de riesgo para el desarrollo de diversas complicaciones que aparecen durante el embarazo, entre las que se incluyen la diabetes gestacional, altas tasas de cesárea, la CIR y desórdenes hipertensivos como la HTA gestacional y la PE (Buddeberg et al., 2019). En cambio, la relación entre estas complicaciones y las posibles alteraciones en los procesos de adaptación de la hemodinámica materna a la gestación en mujeres con obesidad o sobrepeso permanecen sin determinar.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado en un estudio previo (Moreno et al., 2019) que la ingesta de una dieta alta en grasa desde una edad temprana induce sobrepeso en ratas hembras en edad adulta, que está asociado a un aumento del volumen de grasa abdominal (37%), glomeruloesclerosis y a incrementos significativos de la PA. Sin embargo, la respuesta hemodinámica a la gestación no se ha estudiado en este modelo animal. Por tanto, el tercer objetivo de este trabajo de tesis doctoral fue analizar la respuesta hemodinámica a la gestación en ratas con sobrepeso inducido por una ingesta crónica de grasa desde una edad temprana. Los resultados obtenidos demuestran que a pesar de que los niveles pregestacionales del GC estaban disminuidos en estos animales, este parámetro respondió normalmente al embarazo, alcanzando niveles similares a los



observados en el grupo control en la segunda mitad de la gestación. Esta respuesta del GC estuvo acompañada de aumentos en el VS, la FC y el FSR, que no fueron diferentes a los que mostraron las ratas gestantes control. Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurría en el grupo control, la TFG no sufrió cambios significativos en la segunda mitad del embarazo, e incluso disminuyó en la última etapa gestacional. Los valores de GC y VS se corrigieron por el peso corporal, al igual que en todos los otros grupos experimentales, puesto que se ha demostrado que el tamaño y el peso corporal pueden influir en la hemodinámica sistémica (Sarno et al., 2020). De acuerdo con esta idea, Golinska-Grzybala et al. (2021) demostraron que mientras que el GC no fue diferente entre mujeres gestantes de peso normal y obesas en el primer trimestre de gestación, el índice cardíaco fue significativamente menor en estas últimas, sugiriendo que este índice es más adecuado para comparar los parámetros hemodinámicos cuando hay diferencias en el peso corporal.

Los menores valores de GC observados en el periodo previo a la concepción en las ratas con sobrepeso pueden ser debidos a un aumento de las resistencias vasculares periféricas secundario a la presencia de cierto grado de disfunción endotelial en estos animales. Esta hipótesis se apoya en trabajos previos de nuestro grupo, que han demostrado que la alta ingesta de grasa desde edad temprana induce incrementos significativos de la PA en la edad adulta, que son dependientes de la Ang II y que están asociados a elevados niveles plasmáticos de IL-6 (Moreno et al., 2019). Los niveles elevados de esta interleucina son un índice de la presencia de un estado de inflamación, que podría estar contribuyendo al anormal funcionamiento del endotelio en estos animales (Ashraf y Baweja, 2013). En concordancia con estos resultados, varios estudios en sujetos obesos hipertensos han demostrado que la obesidad abdominal está asociada a disminuciones del índice cardíaco, aumentos en la resistencia vascular y alterada función del ventrículo izquierdo (Frag et al., 2004; Jern et al., 1992; Neeland et al., 2013).

El aumento del GC en la segunda mitad de la gestación y la máxima vasodilatación en la circulación renal observada al final de la segunda semana, indican que las ratas con sobrepeso son capaces de responder a este proceso mediante una marcada disminución de las resistencias periféricas. Sin embargo, a pesar de que la PAS disminuyó en la segunda mitad de la gestación, los valores de este parámetro permanecieron significativamente elevados con respecto a los de las ratas gestantes control, sugiriendo que los animales sometidos a una ingesta crónica de grasa muestran una mayor resistencia

vascular en la segunda mitad de la gestación que el grupo de ratas gestantes control. En este sentido, se ha demostrado que las mujeres con HTA esencial normalmente muestran la esperada disminución de la PA característica de la gestación, aunque presentan una aumentada resistencia vascular periférica cuando se comparan con mujeres normotensas (August et al., 2015).

Finalmente, la disminución de la TFG observada al final de la gestación en las ratas con sobrepeso con respecto a las ratas gestantes control, podría ser debida a la disminución de FSR que se observa en esta etapa, además de una reducción en el Kf secundaria a la glomeruloesclerosis e infiltración de linfocitos en el parénquima renal que se han descrito en este modelo experimental (Moreno et al., 2019). Tanto los aumentos en los niveles de leptina como de IL6 observados en estos animales podrían estar contribuyendo a la glomeruloesclerosis y subsecuente pérdida de funcionalidad de los glomérulos provocando, por tanto, la disminución del área de filtración. En este sentido, se ha demostrado que la leptina puede unirse a receptores específicos en las células mesangiales aumentando la síntesis de factores profibróticos en el mesangio (Redon y Lurbe, 2015). Con respecto a la infiltración de linfocitos en el parénquima renal, Bresnahan et al. (1992) demostraron que estas células pueden inducir la contracción de las células mesangiales y así, reducir la superficie de filtración mediante la liberación de tromboxano y metabolitos vasoconstrictores derivados de la 5-lipooxigenasa. De acuerdo con este estudio, existen numerosas evidencias que apuntan a una contribución importante de las células mesangiales en la regulación de la filtración, tanto en condiciones basales como en varias enfermedades renales (Stockand y Sansom, 1998). Estos resultados sugieren que una disminución del Kf podría estar contribuyendo a la disminución de la TFG y a la retención de volumen observada al final de la gestación en las ratas con sobrepeso. En este sentido, los resultados muestran que a pesar de la diferencia de peso entre el grupo control y el de ratas alimentadas con una dieta alta en grasa a lo largo de la gestación, el porcentaje de cambio de este parámetro únicamente fue diferente del observado en el grupo control en la última etapa gestacional, sugiriendo que esta diferencia podría deberse, al menos parcialmente a la mayor retención de volumen secundaria a los descensos de la TFG descritos. En consonancia con esta hipótesis, una sobrecarga de volumen en el tercer trimestre de gestación se ha descrito también en mujeres obesas (Vonck et al., 2019).

Los mayores niveles de PAS que se observan en las ratas con sobrepeso con respecto a los que muestran las ratas gestantes control en la segunda mitad de la gestación sugieren también una adaptación insuficiente de la circulación uteroplacentaria al proceso gestacional, puesto que aunque la hemodinámica en la arteria uterina se comportó de manera similar a la del grupo control, los parámetros hemodinámicos medidos en las arterias radiales en las ratas gestantes con sobrepeso reflejaban una disminución del flujo en estas arterias al final de la gestación. Esta alteración en las arterias radiales podría ser consecuencia de un inadecuado remodelado de estos vasos, o estar mediada por una anormal transformación de las arterias espirales distales dependiente de los trofoblastos. A pesar de que la invasión trofoblástica de estas arterias no se ha examinado en el presente trabajo de tesis doctoral, varios estudios en animales han demostrado que la ingesta de grasa desde edad temprana y durante un periodo prolongado está asociada a alteraciones importantes en este proceso, provocando así a una aumentada resistencia en estos vasos y una subsecuente disminución del aporte de sangre a la placenta. Con respecto a esta hipótesis es importante señalar que, en nuestro estudio, la hiperleptinemia que se observa en el grupo de ratas con sobrepeso, podría estar contribuyendo a esta posible alteración en el remodelado endovascular de las arterias espirales (Spradley et al., 2015). Finalmente, no se puede descartar en el presente trabajo una disminución del diámetro de estas arterias en respuesta a los aumentos de presión que se observan en las ratas con sobrepeso, ya que se ha demostrado que las arterias radiales más proximales se constriñen en presencia de una elevada presión intraluminal. Este mecanismo miogénico se ha observado también en arterial radiales de mujeres gestantes y pone de manifiesto la importancia de este mecanismo en la regulación de la resistencia uterina (Gokina et al., 2003). Por otra parte, la disminución de las velocidades de flujo en las arterias radiales sin cambios en los parámetros hemodinámicos de la arteria uterina podría explicarse por la presencia de las numerosas anastomosis arteriovenosas que conectan las arterias radiales miométriales con la parte venosa de la circulación uterina (Clark et al., 2017; Lloyd-Davies et al., 2021). De este modo, no toda la sangre que procede de las arterias uterinas alcanzaría la placenta, sino que una fracción más o menos variable podría pasar a la circulación venosa a través de estas derivaciones arteriovenosas.

Junto con la obesidad y el sobrepeso, la enfermedad renal es otro de los principales factores de riesgo para el desarrollo de complicaciones gestacionales, entre las que se incluyen la PE y la CIR. En este sentido, se ha demostrado que mujeres que tuvieron BPN

y/o reducido número de nefronas desde etapas tempranas del desarrollo tienen un mayor riesgo de desarrollar HTA y otros eventos adversos durante la gestación. Sin embargo, hasta el momento no existen estudios en mujeres ni en modelos animales experimentales que hayan analizado las adaptaciones cardiovasculares y renales a lo largo de la gestación en madres con reducido número de nefronas desde la etapa perinatal. Por tanto, el cuarto objetivo del presente trabajo de tesis doctoral, estuvo dirigido a determinar si el reducido número de nefronas desde la etapa perinatal va a influir en la respuesta hemodinámica a la gestación, y puede contribuir a alteraciones gestacionales de la PA. Para cumplir dicho objetivo, se utilizó un modelo experimental con reducido número de nefronas inducido por la administración oral de un antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> durante los primeros 14 días de vida. Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que las hembras adultas que fueron tratadas con el antagonista de los receptores AT<sub>1</sub> en la etapa perinatal presentan una disminución del 37% en el número de nefronas, que está asociada a glomeruloesclerosis, PA elevada y una reserva funcional renal reducida (Loria et al., 2007a, 2007b; Saez et al., 2007).

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que las hembras con reducido número de nefronas presentaron un GC y un VS inferiores a las ratas control antes de la concepción y durante todo el embarazo. Una probable disfunción del endotelio secundaria a la reducción del número de nefronas podría estar contribuyendo a los menores niveles de GC y VS observados en este grupo de animales antes y después de la gestación. En este sentido, resultados previos de nuestro grupo de investigación han demostrado que el reducido número de nefronas en estos animales está asociado a niveles elevados de estrés oxidativo (Moreno et al., 2021; Reverte et al., 2013), que como ha sido ampliamente demostrado, es un proceso patológico en el que convergen múltiples factores que pueden causar disfunción de las células endoteliales. Además, se ha demostrado que sujetos con BPN presentan disfunción endotelial (Goodfellow et al., 1998; Leeson et al., 2001) que se manifiesta principalmente como deterioro en la vasodilatación y remodelación vascular dependientes del endotelio. En el presente estudio, las hembras con reducido número de nefronas mostraron una aumentada PAS antes del embarazo, sugiriendo que un aumento de las resistencias vasculares sistémicas podría estar contribuyendo a estos niveles de PA y a los menores valores de GC descritos. Aunque la estructura y el remodelado cardíacos no se han analizado en este estudio, los descensos en el GC y el VS secundarios al reducido número de nefronas se podrían

explicar también por la presencia de alteraciones en las dimensiones de las cavidades cardíacas y/o en el grosor de la pared, puesto que existe una estrecha relación entre este tipo de alteraciones en la estructura cardíaca y un menor número de nefronas o el BPN (Kwon y Kim, 2017; Poladia et al., 2006). A pesar de que el GC y el VS fueron inferiores antes y durante toda la gestación en los animales con reducido número de nefronas, los valores de ambos parámetros, corregidos por el peso corporal de los animales, permanecieron invariables a lo largo del embarazo. En conjunto, estos resultados sugieren una alteración en la respuesta vasodilatadora a la gestación, pues a pesar de que el GC se mantuvo sin cambios, y la PAS disminuyó en la última etapa gestacional, los valores de este parámetro permanecieron significativamente elevados con respecto a los de las ratas gestantes control.

En relación a la hemodinámica renal, las ratas gestantes con menor número de nefronas presentaron valores de FSR y de TFG similares a las ratas control antes de la concepción. Sin embargo, ninguno de estos parámetros sufrió incrementos significativos en respuesta a la gestación. Además, la TFG fue significativamente menor que en el grupo control durante la segunda mitad del embarazo. Estos resultados indican que la respuesta adaptativa renal a la gestación está alterada en los animales con reducido número de nefronas, ya que la vasodilatación renal no fue tan evidente como la que se observa en las ratas gestantes del grupo control. A pesar de que los mecanismos implicados en estas alteraciones no se han determinado en este estudio, esta menor respuesta de la circulación renal podría ser el resultado de un desequilibrio en los niveles de los diferentes factores vasoactivos, que tendría lugar como consecuencia de la posible disfunción endotelial secundaria al reducido número de nefronas desde la etapa perinatal (Goodfellow et al., 1998; Leeson et al., 2001). En este sentido, resultados previos de nuestro grupo han demostrado que las hembras con una menor dotación de nefronas presentan una aumentada sensibilidad renal a Ang II (Reverte et al., 2013), sugiriendo que en estos animales existe una disminución de la actividad de los mecanismos vasodilatadores. Además, la inadecuada respuesta de la TFG a la gestación en el presente estudio, está en consonancia con los resultados de trabajos previos en los que nuestro grupo ha demostrado una reserva funcional renal reducida en estos animales (Loria et al., 2007a). Cuando ocurre una pérdida de nefronas, los glomérulos restantes sufren hipertrofia compensatoria (glomerulomegalia) e hiperfiltración (aumento de la TFG de una sola nefrona) para mantener una función renal adecuada. Sin embargo, esta adaptación se

produce a expensas del aumento de la presión intraglomerular, que acelera la lesión de los glomérulos funcionales y perpetúa el círculo vicioso de la pérdida continua de nefronas (Hostetter et al., 1981). Aunque las ratas con reducido número de nefronas presentan una TFG igual a la de las ratas control en la etapa previa a la concepción, este parámetro no se adapta de forma adecuada a la gestación en estos animales, lo que sugiere que el embarazo supone un test de estrés fisiológico para la función renal materna y pone de manifiesto la dificultad de respuesta que pueden sufrir las mujeres con alteraciones en el desarrollo renal ante situaciones que exigen el reclutamiento máximo de las nefronas funcionales existentes. Finalmente, la ausencia de cambios en la TFG en la primera mitad de la gestación y la disminución de este parámetro en la última etapa gestacional, podrían estar contribuyendo a una mayor retención de volumen en estos animales, que explicaría en parte, los mayores niveles de PAS al final de la gestación en las ratas con reducido número de nefronas. Además, este posible aumento del volumen de fluido con respecto al grupo de ratas gestantes control podría ser la causa de la diferencia de peso observada a lo largo de la gestación entre los dos grupos experimentales.

La reducción en el número de nefronas desde la etapa perinatal indujo también alteraciones en la adaptación de la circulación uteroplacentaria a la gestación. Aunque los cambios en los parámetros hemodinámicos de la arteria uterina a lo largo del embarazo no fueron diferentes de los observados en el grupo control, la PSV, EDV, VM y VTI en las arterias radiales fueron significativamente menores en las ratas con menor número de nefronas que en las ratas control al final de la gestación. Estos resultados sugieren que estos animales presentan una reducida velocidad de flujo en las arterias radiales, que no se observa en la arteria uterina y que es similar a la observada en las ratas gestantes alimentadas con una dieta alta en grasa. La disminución de la velocidad de flujo en estas arterias podría deberse a un mayor efecto de los agentes vasoconstrictores o a la alteración de los procesos de remodelado tanto en las arterias espirales como en las propias arterias radiales, y podría contribuir a los mayores niveles de PA observados en estos animales al final de la gestación. Es posible que el menor GC en estos animales condicione el aporte de sangre a las arterias espirales interfiriendo así, en su proceso de remodelado, puesto que como se ha citado anteriormente estos vasos requieren unas condiciones óptimas de perfusión previas al inicio de la invasión trofoblástica endovascular (Zenclussen et al., 2003). Además, se ha demostrado que el diámetro de las arterias radiales está disminuido en mujeres con PE (Ong et al., 2005). Del mismo modo que se ha argumentado en la

discusión de los resultados obtenidos en el grupo de ratas con sobrepeso, no podemos descartar en este grupo la acción del mecanismo miogénico sobre el diámetro de las arterias radiales, puesto que juega un papel muy importante en la regulación de la resistencia de la circulación uterina durante la gestación (Gokina et al., 2003). A pesar de que el mecanismo o mecanismos que median la menor velocidad de flujo en las arterias radiales observada en el grupo de animales con reducido número de nefronas no se puede determinar a partir del presente estudio, los resultados obtenidos sugieren que en estos animales existe una alteración en los mecanismos de adaptación de la circulación uteroplacentaria en la última etapa gestacional, que van a contribuir probablemente al menor descenso de la PA y a la disminución del aporte de sangre a la placenta (Lloyd-Davies et al., 2021).

Estos resultados indican que un reducido número de nefronas desde la etapa perinatal condiciona de forma moderada la respuesta hemodinámica a la gestación. Aunque estos animales responden al embarazo mediante aumentos en el GC asociados a una vasodilatación significativa de la circulación renal y uteroplacentaria, estos cambios no se producen de la forma correcta, de manera que no son suficientes para mantener los niveles de PA dentro de los rangos normales, y posiblemente tampoco para atender adecuadamente las demandas maternas, y del feto en desarrollo.

Excepto en los casos más severos de programación durante el desarrollo del número de nefronas, el reducido número de estas no es la única causa de disfunción renal. Como se puede concluir de los resultados anteriores, un riñón con menos nefronas desde la etapa perinatal tiene una menor capacidad para responder a situaciones que exigen el reclutamiento de la reserva funcional renal, de manera que un segundo o tercer “hit” puede acelerar el daño renal y por tanto, provocar una clara manifestación de la enfermedad (Luyckx y Brenner, 2020). Se ha demostrado que entre los niños que presentan proteinuria, la progresión de la enfermedad renal es más rápida en aquellos nacidos a pretérmino y que posteriormente desarrollan obesidad (Abitbol et al., 2009), sugiriendo que esta es un factor de riesgo importante para la aparición de grados más severos de la enfermedad. Además, hay considerables evidencias que apuntan a que un rápido aumento en la ingesta calórica después del nacimiento en niños prematuros o con BPN puede acelerar la evolución de la enfermedad renal programada (Koleganova et al., 2012). Nuestro grupo de investigación ha demostrado en un trabajo previo, que una alta ingesta de grasa desde una edad temprana en ratas hembra con reducido número de

nefronas induce niveles elevados de PA en la edad adulta, los cuales están asociados a sobrepeso, aumento del volumen de grasa abdominal y altos niveles de leptina plasmática. Además, la ingesta crónica de grasa en estos animales provoca una mayor glomeruloesclerosis, mayores niveles de estrés oxidativo y un incremento significativo en el grado de infiltración renal por linfocitos T y macrófagos, con respecto a las hembras con reducido número de nefronas que ingirieron una dieta normal (Moreno et al., 2021). Sin embargo, hasta el momento no se ha determinado si la ingesta crónica de grasa desde una edad temprana potencia los efectos del reducido número de nefronas sobre la adaptación hemodinámica a la gestación. Con todos estos antecedentes se planteó el último objetivo del presente trabajo de tesis doctoral, el cual consistió en determinar si una alta ingesta de grasa desde edad temprana potencia los efectos negativos de la disminución del número de nefronas desde la epata perinatal en la respuesta hemodinámica a la gestación, aumentando la predisposición al desarrollo de complicaciones gestacionales.

La ingesta de grasa en los animales con reducido número de nefronas provocó un descenso significativo del GC al final de la segunda semana de gestación que no se observó en ninguno de los otros grupos experimentales, y que estuvo causado principalmente por un descenso paralelo en el VS, puesto que la FC aumentó en esta etapa hasta niveles similares a los observados en el grupo control y en el resto de grupos experimentales. A pesar de que los valores de GC no fueron estadísticamente diferentes entre los dos grupos con reducido número de nefronas, la alta ingesta de grasa indujo un patrón de cambio de GC, VS y FC durante el embarazo diferente al observado en las hembras con menor dotación de nefronas y alimentadas con una dieta de contenido normal en grasa, sugiriendo una menor dilatación de la vasculatura en respuesta a la gestación. En este sentido, y a diferencia de lo que ocurría en el resto de grupos experimentales, la PAS no sufrió los descensos gestacionales característicos en la última etapa del embarazo. También se observó en este grupo de animales una disminución en la FC al final de la gestación, que no ocurría en ninguno de los otros grupos experimentales. Aunque en la presente tesis doctoral no se han analizado los mecanismos relacionados con los cambios en este parámetro a lo largo de la gestación, este descenso podría ser debido a una alteración de la respuesta del sistema nervioso autónomo. Esta hipótesis se apoya en los resultados de una revisión sistemática en la que se incluyeron 23 estudios clínicos en mujeres embarazadas, y a partir de la cual se concluyó que las



mujeres obesas y aquellas con alto riesgo de desarrollar complicaciones gestacionales, presentaban una inadecuada respuesta autónoma a la gestación mostrando una reducida FC al final del embarazo (Helmreich et al., 2008).

Por otra parte, el descenso del GC en estos animales estuvo asociado a una marcada vasoconstricción renal, por lo que probablemente esta inadecuada respuesta de la circulación renal podría ser una de las causas del menor GC observado al final de la segunda semana de gestación. Como ya se discutió previamente, la circulación renal contribuye de forma significativa a los marcados descensos en las resistencias vasculares sistémicas, que se producen durante las primeras etapas de la gestación, y que son el punto de partida para los aumentos posteriores en el VS y GC. Un mayor grado de disfunción endotelial provocado por la alta ingesta de grasa en los animales con reducido número de nefronas podría estar contribuyendo a esta menor vasodilatación sistémica, ya que estos individuos presentan niveles de estrés oxidativo y de leptina plasmática superiores a los observados en el grupo de animales con reducido número de nefronas alimentados con una dieta normalizada, además de una mayor sensibilidad a la Ang II (Moreno et al., 2019). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en un estudio realizado en adolescentes con sobrepeso que fueron prematuros al nacer. Los autores del estudio concluyeron que el mayor peso en los individuos nacidos pretérmino, está relacionado con unos mayores niveles de Ang II y menores de Ang (1-7) en la circulación, que podrían explicar el elevado riesgo de estos sujetos para desarrollar enfermedad cardiovascular e HTA en la edad adulta. Un desequilibrio en los niveles de Ang II/Ang (1-7) se ha asociado con incrementos significativos de la PA, vasoconstricción, así como, con inflamación, aumentos en el estrés oxidativo y fibrosis en varios órganos, entre los que se incluyen el riñón y el corazón (South et al., 2019).

A pesar de que la alta ingesta de grasa potenció la vasoconstricción renal inducida por el reducido número de nefronas durante la gestación, la TFG no sufrió mayores disminuciones con respecto al grupo control que las observadas en el grupo de animales con menos nefronas, pero alimentados con una dieta normal. Sin embargo, la inadecuada respuesta de este parámetro al final de la gestación y la aumentada PAS que muestra este grupo de animales en esta etapa con respecto al resto de grupos experimentales, sugiere que las nefronas funcionales en los riñones de estos individuos podrían estar sometidas a una mayor presión de filtración, pudiendo así, acelerar la lesión de los glomérulos funcionales y consecuentemente la pérdida de nefronas.

Del mismo modo que ocurría con la hemodinámica renal, la ingesta crónica de grasa potenció las alteraciones en la respuesta de la circulación uteroplacentaria a la gestación secundarias al reducido número de nefronas, de manera que en los animales de este grupo experimental no se observaron los cambios en las velocidades de flujo de la arteria uterina característicos del embarazo. Además, los valores de estos parámetros fueron inferiores a los del grupo control y a los del resto de grupos experimentales en la última etapa de la gestación, lo cual sugiere que la disminución en el GC que se produjo en estos animales en la última etapa gestacional podría estar condicionando la hemodinámica de la arteria uterina en esta etapa. Además, una reducida vasodilatación en la arteria uterina secundaria, tanto una mayor sensibilidad a los agentes vasoconstrictores como a una alteración en el proceso de remodelado, que se ha descrito en estas arterias, podría estar contribuyendo adicionalmente a las citadas alteraciones de los parámetros hemodinámicos (Osol y Moore, 2014). Este proceso de remodelado altera la estructura arterial y también la respuesta a estímulos físicos y químicos a lo largo de la gestación (Hammer y Cipolla, 2005). Los factores implicados en el remodelado vascular incluyen factores hormonales o vasoactivos, el “shear stress” y la presión intraluminal y factores moleculares a nivel local (remodelado placentario). Los tres mecanismos se han descrito en el embarazo, pero su grado de importancia es dependiente de la etapa gestacional. Dado que en la primera etapa de la gestación predominan los factores hormonales y vasodilatadores, los descensos en las velocidades de flujo de la arteria uterina que se observan al final de la segunda etapa gestacional en nuestro estudio, podrían explicarse por un desequilibrio entre la acción de los factores vasodilatadores y vasoconstrictores secundario al inadecuado funcionamiento del endotelio. Como ya se ha señalado anteriormente, la alta ingesta de grasa amplifica los niveles de estrés oxidativo y potencia la sensibilidad a la Ang II en los animales con reducido número de nefronas, lo que sugiere que una mayor severidad en la disfunción endotelial podría contribuir a la alterada respuesta hemodinámica de la arteria uterina. Por otro lado, los mayores niveles de PAS en estos animales con respecto al resto de grupos experimentales durante toda la gestación y el aumento de la resistencia vascular podrían llevar a un proceso de remodelado anómalo mediado por el “shear stress”, y consecuentemente a una disminución de la luz de la arteria. Finalmente, un remodelado defectuoso de las arterias espirales placentarias podría contribuir adicionalmente a los mayores descensos de las velocidades de flujo de la arteria uterina que se observan al final del embarazo, ya que en la rata estos procesos se completan en la última etapa gestacional. Los descensos en las

velocidades de flujo que se observan en las arterias radiales al final de la gestación apoyan esta hipótesis, puesto que sugieren una elevada resistencia en la circulación placentaria. Es importante destacar que los descensos del GC inducidos por la ingesta de grasa en los animales con reducido número de nefronas que se observan al final de la segunda semana de gestación, podrían estar contribuyendo a las posibles alteraciones del remodelado vascular en las arterias espirales placentarias, debido a que se ha sugerido que el acondicionamiento previo de las arterias espirales precede a la invasión trofoblástica endovascular (Zenclussen et al., 2003). De manera que un FSU reducido y el “shear stress” podrían influir negativamente en las interacciones entre las células del músculo liso vascular y endotelial necesarias para el proceso de remodelación de las arterias espirales (Whitley y Cartwright, 2010). De acuerdo con esta hipótesis, y como ya se discutió previamente, se ha demostrado que los embarazos humanos con un patrón de flujo de la arteria uterina de baja resistencia obtenido por ecografía Doppler, se asocian con una invasión trofoblástica de los vasos deciduales más extensa que los embarazos con un patrón de flujo de alta resistencia (Prefumo et al., 2004).

En resumen, todos estos resultados indican que el sobrepeso inducido por la ingesta crónica de grasa desde edad temprana agrava las alteraciones en la respuesta hemodinámica renal y uteroplacentaria a la gestación, provocadas por un déficit de nefronas desde la etapa perinatal. Los lechos vasculares, renal y uteroplacentario sufren una importante vasoconstricción, que está asociada a una marcada disminución en el GC y elevados niveles de PA a lo largo de la gestación, alteraciones todas ellas similares a las que se observan en mujeres con PE. Estas alteraciones son también mucho más evidentes que las que se observan en los animales con sobrepeso con una dotación normal de nefronas. Todo ello sugiere que mientras que el sobrepeso o el déficit de nefronas desde la etapa perinatal, de forma independiente, desencadenan alteraciones moderadas en la respuesta hemodinámica a la gestación, la coexistencia de ambos puede potenciar estas alteraciones y suponer un factor de riesgo importante para la aparición de severas complicaciones gestacionales y eventos hipertensivos como la PE, que van a afectar la adecuada evolución del embarazo y el óptimo desarrollo fetal. Además, el embarazo en estas condiciones puede suponer un estrés añadido sobre el organismo materno, agravando y acelerando enfermedades subyacentes, y sobre el feto, influyendo en los mecanismos de programación fetal de la enfermedad.



# CONCLUSIONES



## 6 CONCLUSIONES

- ✓ La rata grávida responde a la gestación de manera similar a la mujer gestante, mostrando una vasodilatación significativa de los lechos vasculares renal y uteroplacentario, que está asociada a cambios paralelos en el GC y a marcados descensos de la PA.
- ✓ La vasodilatación renal es una de las primeras adaptaciones que se producen en la rata gestante, y al igual que en la mujer, precede a los máximos incrementos del GC que se observan durante la gestación, a pesar de que estos incrementos tienen lugar en etapas gestacionales relativamente diferentes en ambas especies.
- ✓ En la rata gestante, la relación entre el FSR y la TFG cambia a lo largo de la gestación. Mientras que ambos parámetros sufren cambios paralelos durante las dos primeras semanas de gestación, únicamente la TFG muestra aumentos significativos al final de la misma.
- ✓ La máxima vasodilatación en la circulación uteroplacentaria se observa al final de la gestación, coincidiendo con los mayores incrementos en el GC y los menores niveles de PAS y FSR.
- ✓ Las alteraciones en el proceso de remodelado de las arterias espirales y los incrementos de PA inducidos por la inhibición de la actividad de la hemo-oxigenasa en la última etapa gestacional, están asociados a alteraciones simultáneas en los parámetros hemodinámicos determinados en las arterias radiales y uterina al final de la gestación.
- ✓ La ingesta elevada de grasa desde edad temprana no modifica la respuesta del GC y del FSR a la gestación, pero provoca alteraciones significativas en los niveles de PAS en la última etapa gestacional, que están asociadas a una insuficiente adaptación hemodinámica de la circulación uteroplacentaria distal, puesto que únicamente las arterias radiales mostraron disminuciones significativas en las velocidades de flujo.

- ✓ La ingesta elevada de grasa desde edad temprana alteró también la respuesta de la TFG a la gestación, de manera que este parámetro no mostró cambios significativos en la segunda mitad del embarazo, e incluso disminuyó en la última etapa gestacional.
- ✓ Las ratas gestantes con déficit de nefronas desde la etapa perinatal mostraron una disminución del GC y un aumento de la PAS con respecto a las ratas control en todas las etapas gestacionales. Estas alteraciones estuvieron asociadas a una disminuida respuesta adaptativa de la circulación renal y de la vasculatura uteroplacentaria, con marcados descensos de la TFG y reducciones moderadas en las velocidades de flujo en las arterias radiales en la segunda mitad de la gestación.
- ✓ El sobrepeso inducido por la ingesta crónica de grasa desde edad temprana agrava las alteraciones en la respuesta hemodinámica renal y uteroplacentaria a la gestación, provocadas por un déficit de nefronas desde la etapa perinatal. En estas condiciones, los lechos vasculares renal y uteroplacentario, muestran una importante vasoconstricción, que está asociada a una marcada disminución en el GC y elevados niveles de PAS a lo largo de la gestación.
- ✓ Las disminuciones del GC previas a la concepción o la respuesta anómala de este parámetro a la gestación, parecen condicionar una parte importante de las alteraciones hemodinámicas de la circulación renal y uteroplacentaria que se observan durante la segunda mitad de la gestación, lo cual implica que la determinación del GC en etapas gestacionales tempranas podría ser un índice útil para la detección y prevención de posibles complicaciones que aparecen en la última etapa de la gestación.
- ✓ Finalmente, mientras que el sobrepeso o el déficit de nefronas desde la etapa perinatal desencadenan alteraciones moderadas en la respuesta hemodinámica a la gestación, la coexistencia de ambos agrava estas alteraciones y supone un factor de riesgo importante para la aparición de severas complicaciones gestacionales y eventos hipertensivos, que tienen bastante similitud con los que se observan en mujeres con PE. Estas complicaciones pueden afectar a la evolución adecuada del embarazo y al óptimo desarrollo fetal, suponiendo además un “estrés” añadido



sobre el organismo materno, agravando y acelerando enfermedades subyacentes, y favoreciendo los procesos de programación fetal de la enfermedad.



# **BIBLIOGRAFÍA**



## 7 BIBLIOGRAFÍA

- Abd El Aal, D. E. M., y Künzel, W. (1994). Blood flow velocity in the uterine and external iliac arteries before and after termination of pregnancy. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 53(1), 11-16.
- Abitbol, C. L., Chandar, J., Rodríguez, M. M., Berho, M., Seeherunvong, W., Freundlich, M., y Zilleruelo, G. (2009). Obesity and preterm birth: additive risks in the progression of kidney disease in children. *Pediatric nephrology*, 24(7), 1363-1370.
- Abou El Hassan, M., Diamandis, E. P., Karumanchi, S. A., Shennan, A. H., y Taylor, R. N. (2015). Preeclampsia: an old disease with new tools for better diagnosis and risk management. *Clinical chemistry*, 61(5), 694-698.
- Abram, S., Alexander, B., Bennett, W., y Granger, J. (2001). Role of neuronal nitric oxide synthase in mediating renal hemodynamic changes during pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 281(5), R1390-R1393.
- Acácio, G. L. (2002). Uterine artery Doppler patterns in abdominal pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 20(2), 194-196.
- Ain, R., Canham, L. N., y Soares, M. J. (2003). Gestation stage-dependent intrauterine trophoblast cell invasion in the rat and mouse: novel endocrine phenotype and regulation. *Developmental biology*, 260(1), 176-190.
- Alexander, B. T., Miller, M. T., Kassab, S., Novak, J., Reckelhoff, J. F., Kruckeberg, W. C., y Granger, J. P. (1999). Differential expression of renal nitric oxide synthase isoforms during pregnancy in rats. *Hypertension*, 33(1), 435-439.
- Altorjay, Á. T., Surányi, A., Nyári, T., y Németh, G. (2017). Use of placental vascularization indices and uterine artery peak systolic velocity in early detection of pregnancies complicated by gestational diabetes, chronic or gestational hypertension, and preeclampsia at risk. *Croatian Medical Journal*, 58(2), 161.

- Andraweera, P. H., Dekker, G., Leemaqz, S., McCowan, L., Myers, J., Kenny, L., . . . consortium, S. (2019). Effect of birth weight and early pregnancy BMI on risk for pregnancy complications. *Obesity*, 27(2), 237-244.
- Anton, L., y Brosnihan, K. B. (2008). Systemic and uteroplacental renin—angiotensin system in normal and pre-eclamptic pregnancies. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*, 2(5), 349-362.
- Anumba, D. O., El Gelany, S., Elliott, S. L., y Li, T. C. (2009). Serum relaxin levels are reduced in pregnant women with a history of recurrent miscarriage, and correlate with maternal uterine artery Doppler indices in first trimester. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 147(1), 41-45.
- Apaza Valencia, J., y Delgado Rendón, J. (2015). Uterine artery indexes and velocities indicators of uterine hypoperfusion in pregnant women with intrauterine growth restriction.
- Arikawe, A., Udenze, I., Olusanya, A., Akinnibosun, O., Dike, I., y Duru, B. (2019). L-arginine supplementation lowers blood pressure, protein excretion and plasma lipid profile in experimental salt-induced hypertension in pregnancy: Relevance to preeclampsia. *Pathophysiology*, 26(3-4), 191-197.
- Armaly, Z., Jadaon, J. E., Jabbour, A., y Abassi, Z. A. (2018). Preeclampsia: novel mechanisms and potential therapeutic approaches. *Frontiers in physiology*, 9, 973.
- Armstrong, S., Fernando, R., y Columb, M. (2011). Minimally-and non-invasive assessment of maternal cardiac output: go with the flow! *International Journal of Obstetric Anesthesia*, 20(4), 330-340.
- Arthuis, C., Novell, A., Escoffre, J.-M., Patat, F., Bouakaz, A., y Perrotin, F. (2013). New insights into uteroplacental perfusion: quantitative analysis using Doppler and contrast-enhanced ultrasound imaging. *Placenta*, 34(5), 424-431.
- Ashraf, M. J., y Baweja, P. (2013). Obesity: the ‘huge’ problem in cardiovascular diseases. *Missouri medicine*, 110(6), 499.
- Assali, N., Rauramo, L., y Peltonen, T. (1960). Measurement of uterine blood flow and uterine metabolism. 8. Uterine and fetal blood flow and oxygen consumption in early human pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 79, 86-98.
- Atherton, J., y Pirie, S. (1981). The effect of pregnancy on glomerular filtration rate and salt and water reabsorption in the rat. *The Journal of Physiology*, 319(1), 153-164.

- August, P., Jeyabalan, A., y Roberts, J. M. (2015). Chronic hypertension and pregnancy. *Chesley's hypertensive disorders in pregnancy*, 397-417.
- Bainbridge, S., Farley, A., McLaughlin, B., Graham, C., Marks, G., Nakatsu, K., . . . Smith, G. (2002). Carbon monoxide decreases perfusion pressure in isolated human placenta. *Placenta*, 23(8-9), 563-569.
- Barker, D. J., y Osmond, C. (1986). Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet*, 327(8489), 1077-1081.
- Bathgate, R., Halls, M. L., van der Westhuizen, E. T., Callander, G., Kocan, M., y Summers, R. J. (2013). Relaxin family peptides and their receptors. *Physiological reviews*, 93(1), 405-480.
- Baylis, C. (1980). The mechanism of the increase in glomerular filtration rate in the twelve-day pregnant rat. *The Journal of Physiology*, 305(1), 405-414.
- Baylis, C. (1994). 2 Glomerular filtration and volume regulation in gravid animal models. *Baillière's clinical obstetrics and gynaecology*, 8(2), 235-264.
- Baylis, C. (2003). Impact of pregnancy on underlying renal disease. *Advances in renal replacement therapy*, 10(1), 31-39.
- Beauséjour, A., Auger, K., St-Louis, J., y Brochu, M. (2003). High-sodium intake prevents pregnancy-induced decrease of blood pressure in the rat. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*.
- Berkane, N., Liere, P., Oudinet, J.-P., Hertig, A., Lefevre, G., Pluchino, N., . . . Chabbert-Buffet, N. (2017). From pregnancy to preeclampsia: a key role for estrogens. *Endocrine reviews*, 38(2), 123-144.
- Bibeau, K., Sicotte, B., Béland, M., Bhat, M., Gaboury, L., Couture, R., . . . Brochu, M. (2016). Placental underperfusion in a rat model of intrauterine growth restriction induced by a reduced plasma volume expansion. *PloS one*, 11(1), e0145982.
- Binder, J., Monaghan, C., Thilaganathan, B., Carta, S., y Khalil, A. (2018). De-novo abnormal uteroplacental circulation in third trimester: pregnancy outcome and pathological implications. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 52(1), 60-65.
- Blanco, P. G., Tórtora, M., Rodríguez, R., Arias, D. O., y Gobello, C. (2011). Ultrasonographic assessment of maternal cardiac function and peripheral circulation during normal gestation in dogs. *The Veterinary Journal*, 190(1), 154-159.
- Boeldt, D., y Bird, I. (2017). Vascular adaptation in pregnancy and endothelial dysfunction in preeclampsia. *The Journal of endocrinology*, 232(1), R27.

- Borghi, C., Cicero, A. F. G., Degli Esposti, D., Immordino, V., Bacchelli, S., Rizzo, N., . . . Ambrosioni, E. (2011). Hemodynamic and neurohumoral profile in patients with different types of hypertension in pregnancy. *Internal and emergency medicine*, 6(3), 227-234.
- Bower, S., Vyas, S., Campbell, S., y Nicolaides, K. (1992). Color Doppler imaging of the uterine artery in pregnancy: normal ranges of impedance to blood flow, mean velocity and volume of flow. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 2(4), 261-265.
- Brenner, B. M., Garcia, D. L., y Anderson, S. (1988). Glomeruli and blood pressure: less of one, more the other? *American journal of hypertension*, 1(4\_Pt\_1), 335-347.
- Bresnahan, B., Wu, S., Fenoy, F., Roman, R., y Lianos, E. (1992). Mesangial cell immune injury. Hemodynamic role of leukocyte-and platelet-derived eicosanoids. *The Journal of clinical investigation*, 90(6), 2304-2312.
- Brosens, I., Puttemans, P., y Benagiano, G. (2019). Placental bed research: I. The placental bed: from spiral arteries remodeling to the great obstetrical syndromes. *American journal of obstetrics and gynecology*, 221(5), 437-456.
- Brown, A. G., Leite, R. S., y STRAUSS III, J. F. (2004). Mechanisms underlying “functional” progesterone withdrawal at parturition. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1034(1), 36-49.
- Bruce, N. (1976). The distribution of blood flow to the reproductive organs of rats near term. *Reproduction*, 46(2), 359-362.
- Buddeberg, B. S., Sharma, R., O'Driscoll, J. M., Kaelin Agten, A., Khalil, A., y Thilaganathan, B. (2019). Cardiac maladaptation in obese pregnant women at term. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 54(3), 344-349.
- Burton, G., Woods, A., Jauniaux, E., y Kingdom, J. (2009). Rheological and physiological consequences of conversion of the maternal spiral arteries for uteroplacental blood flow during human pregnancy. *Placenta*, 30(6), 473-482.
- Caluwaerts, S., Vercruyse, L., Luyten, C., y Pijnenborg, R. (2005). Endovascular trophoblast invasion and associated structural changes in uterine spiral arteries of the pregnant rat. *Placenta*, 26(7), 574-584.
- Carlström, M., Wentzel, P., Skøtt, O., Persson, A. E. G., y Eriksson, U. J. (2009). Angiogenesis inhibition causes hypertension and placental dysfunction in a rat model of preeclampsia. *Journal of hypertension*, 27(4), 829-837.



- Carter, A. M., Enders, A., Jones, C. J., Mess, A., Pfarrer, C., Pijnenborg, R., y Soma, H. (2006). Comparative Placentation and animal models: patterns of trophoblast invasion-a workshop report. *Placenta*, 27, 30-33.
- Clapp III, J. F. (1978). Cardiac output and uterine blood flow in the pregnant ewe. *American journal of obstetrics and gynecology*, 130(4), 419-423.
- Clark, N., Pru, C., y Pru, J. (2017). Novel regulators of hemodynamics in the pregnant uterus. *Progress in molecular biology and translational science*, 145, 181-216.
- Clark, S. L., Cotton, D. B., Lee, W., Bishop, C., Hill, T., Southwick, J., . . . Phelan, J. (1989). Central hemodynamic assessment of normal term pregnancy. *American journal of obstetrics and gynecology*, 161(6), 1439-1442.
- Collins, S., Grant, D., Black, R., Vellayan, M., y Impey, L. (2011). Abdominal pregnancy: a perfusion confusion? *Placenta*, 32(10), 793-795.
- Conrad, K. P. (1984). Renal hemodynamics during pregnancy in chronically catheterized, conscious rats. *Kidney international*, 26(1), 24-29.
- Conrad, K. P. (1987). Possible mechanisms for changes in renal hemodynamics during pregnancy: studies from animal models. *American Journal of Kidney Diseases*, 9(4), 253-259.
- Conrad, K. P. (2011). Emerging role of relaxin in the maternal adaptations to normal pregnancy: implications for preeclampsia. *Seminars in nephrology*,
- Conrad, K. P., y Davison, J. M. (2014). The renal circulation in normal pregnancy and preeclampsia: is there a place for relaxin? *American Journal of Physiology-Renal Physiology*.
- Conrad, K. P., y Lindheimer, M. D. (1999). Renal and cardiovascular alterations. *Chesley's hypertensive disorders in pregnancy*, 2, 263-326.
- Conrad, K. P., Stillman, I. E., y Lindheimer, M. D. (2015). The kidney in normal pregnancy and preeclampsia. In *Chesley's hypertensive disorders in pregnancy* (pp. 335-377). Elsevier.
- Craven, C., Morgan, T., y Ward, K. (1998). Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta*, 19(4), 241-252.
- Chang, J., y Streitman, D. (2012). Physiologic adaptations to pregnancy. *Neurologic Clinics*, 30(3), 781-789.
- Chang, K., y Zhang, L. (2008). Steroid hormones and uterine vascular adaptation to pregnancy. *Reproductive Sciences*, 15(4), 336-348.

- Chapman, A. B., Abraham, W. T., Zamudio, S., Coffin, C., Merouani, A., Young, D., . . . Moore, L. G. (1998). Temporal relationships between hormonal and hemodynamic changes in early human pregnancy. *Kidney international*, *54*(6), 2056-2063.
- Choi, J. W., Im, M. W., y Pai, S. H. (2002). Nitric oxide production increases during normal pregnancy and decreases in preeclampsia. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, *32*(3), 257-263.
- Chung, E., y Leinwand, L. A. (2014). Pregnancy as a cardiac stress model. *Cardiovascular research*, *101*(4), 561-570.
- Churchill, S. E., Bengel, H. H., y Alexander, E. A. (1982). Renal function in the term pregnant rat: A micropuncture study. *Kidney and Blood Pressure Research*, *5*(1), 1-9.
- Danielson, L., y Conrad, K. (1995). Acute blockade of nitric oxide synthase inhibits renal vasodilation and hyperfiltration during pregnancy in chronically instrumented conscious rats. *The Journal of clinical investigation*, *96*(1), 482-490.
- Davison, J., y Noble, M. (1981). Serial changes in 24 hour creatinine clearance during normal menstrual cycles and the first trimester of pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *88*(1), 10-17.
- de Boer, M. P., IJzerman, R. G., de Jongh, R. T., Eringa, E. C., Stehouwer, C. D., Smulders, Y. M., y Serné, E. H. (2008). Birth weight relates to salt sensitivity of blood pressure in healthy adults. *Hypertension*, *51*(4), 928-932.
- de Jong, F., Monuteaux, M. C., van Elburg, R. M., Gillman, M. W., y Belfort, M. B. (2012). Systematic review and meta-analysis of preterm birth and later systolic blood pressure. *Hypertension*, *59*(2), 226-234.
- Deng, A., Engels, K., y Baylis, C. (1996). Impact of nitric oxide deficiency on blood pressure and glomerular hemodynamic adaptations to pregnancy in the rat. *Kidney international*, *50*(4), 1132-1138.
- Desai, D. K., Moodley, J., y Naidoo, D. P. (2004). Echocardiographic assessment of cardiovascular hemodynamics in normal pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, *104*(1), 20-29.
- Dunlop, W. (1981). Serial changes in renal haemodynamics during normal human pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, *88*(1), 1-9.

- Edman, C., Toofanian, A., MacDonald, P., y Gant, N. (1981). Placental clearance rate of maternal plasma androstenedione through placental estradiol formation: an indirect method of assessing uteroplacental blood flow. *American journal of obstetrics and gynecology*, 141(8), 1029-1037.
- Eisenstein, R. S., Garcia-Mayol, D., Pettingell, W., y Munro, H. N. (1991). Regulation of ferritin and heme oxygenase synthesis in rat fibroblasts by different forms of iron. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(3), 688-692.
- Ejerblad, E., Fored, C. M., Lindblad, P., Fryzek, J., McLaughlin, J. K., y Nyrén, O. (2006). Obesity and risk for chronic renal failure. *Journal of the American Society of Nephrology*, 17(6), 1695-1702.
- Eknoyan, G. (2007). Chronic kidney disease definition and classification: the quest for refinements. *Kidney international*, 72(10), 1183-1185.
- Estensen, M., Beitnes, J., Grindheim, G., Aaberge, L., Smiseth, O., Henriksen, T., y Aakhus, S. (2013). Altered maternal left ventricular contractility and function during normal pregnancy. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 41(6), 659-666.
- Farag, N. H., Matthews, S. C., Brzezinski, E., Nelesen, R. A., y Mills, P. J. (2004). Relationship between central obesity and cardiovascular hemodynamic indices in postmenopausal women. *Fertility and sterility*, 81(2), 465-467.
- Fiol, G., Machado, F., Hernandez, I., Inglés, A. C., Abad, L., Parrilla, J. J., . . . Carbonell, L. F. (1998). Role of nitric oxide on the central hemodynamic response to acute volume expansion in the pregnant rat. *American journal of obstetrics and gynecology*, 178(4), 823-829.
- Flo, K., Wilsgaard, T., y Acharya, G. (2011). A new non-invasive method for measuring uterine vascular resistance and its relationship to uterine artery Doppler indices: a longitudinal study. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 37(5), 538-542.
- Flo, K., Wilsgaard, T., Vårtun, Å., y Acharya, G. (2010). A longitudinal study of the relationship between maternal cardiac output measured by impedance cardiography and uterine artery blood flow in the second half of pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 117(7), 837-844.
- Fonseca, B. M., Correia-da-Silva, G., y Teixeira, N. A. (2012). The rat as an animal model for fetoplacental development: a reappraisal of the post-implantation period. *Reproductive biology*, 12(2), 97-118.

- Foo, F. L., Mahendru, A. A., Masini, G., Fraser, A., Cacciatore, S., MacIntyre, D. A., . . . Lees, C. C. (2018). Association between prepregnancy cardiovascular function and subsequent preeclampsia or fetal growth restriction. *Hypertension*, *72*(2), 442-450.
- Frias, A. E., Morgan, T. K., Evans, A. E., Rasanen, J., Oh, K. Y., Thornburg, K. L., y Grove, K. L. (2011). Maternal high-fat diet disturbs uteroplacental hemodynamics and increases the frequency of stillbirth in a nonhuman primate model of excess nutrition. *Endocrinology*, *152*(6), 2456-2464.
- Fushima, T., Sekimoto, A., Minato, T., Ito, T., Oe, Y., Kisu, K., . . . Kimura, Y. (2016). Reduced uterine perfusion pressure (RUPP) model of preeclampsia in mice. *PLoS one*, *11*(5), e0155426.
- Gagliardi, G., Tiralongo, G., LoPresti, D., Pisani, I., Farsetti, D., Vasapollo, B., . . . Valensise, H. (2017). Screening for pre-eclampsia in the first trimester: role of maternal hemodynamics and bioimpedance in non-obese patients. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, *50*(5), 584-588.
- Gaillard, R., Steegers, E. A., Hofman, A., y Jaddoe, V. W. (2011). Associations of maternal obesity with blood pressure and the risks of gestational hypertensive disorders. The Generation R Study. *Journal of hypertension*, *29*(5), 937-944.
- Galtier-Dereure, F., Boegner, C., y Bringer, J. (2000). Obesity and pregnancy: complications and cost. *The American journal of clinical nutrition*, *71*(5), 1242S-1248S.
- George, E. M., Cockrell, K., Aranay, M., Csongradi, E., Stec, D. E., y Granger, J. P. (2011). Induction of heme oxygenase 1 attenuates placental ischemia-induced hypertension. *Hypertension*, *57*(5), 941-948.
- George, E. M., Hosick, P. A., Stec, D. E., y Granger, J. P. (2013). Heme oxygenase inhibition increases blood pressure in pregnant rats. *American journal of hypertension*, *26*(7), 924-930.
- George, E. M., Warrington, J. P., Spradley, F. T., Palei, A. C., y Granger, J. P. (2014). The heme oxygenases: important regulators of pregnancy and preeclampsia. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, *307*(7), R769-R777.
- Geusens, N., Verlohren, S., Luyten, C., Taube, M., Hering, L., Vercruyse, L., . . . Pijnenborg, R. (2008). Endovascular trophoblast invasion, spiral artery

- remodelling and uteroplacental haemodynamics in a transgenic rat model of preeclampsia. *Placenta*, 29(7), 614-623.
- Gilbert, J. S., y Nijland, M. J. (2008). Sex differences in the developmental origins of hypertension and cardiorenal disease. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 295(6), R1941-R1952.
- Gilson, G. J., Mosher, M. D., y Conrad, K. P. (1992). Systemic hemodynamics and oxygen transport during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 263(6), H1911-H1918.
- Gillis, E. E., Sasser, J. M., y Sullivan, J. C. (2016). Endothelin, sex, and pregnancy: unique considerations for blood pressure control in females. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 310(8), R691-R696.
- Gokina, N. I., Mandalà, M., y Osol, G. (2003). Induction of localized differences in rat uterine radial artery behavior and structure during gestation. *American journal of obstetrics and gynecology*, 189(5), 1489-1493.
- Golinska-Grzybala, K., Wiechec, M., Golinski, B., Rostoff, P., Szłóarczyk, B., Gackowski, A., . . . Konduracka, E. (2021). Subclinical cardiac performance in obese and overweight women as a potential risk factor of preeclampsia. *Pregnancy hypertension*, 23, 131-135.
- Gomez, O., Figueras, F., Martinez, J., Del Rio, M., Palacio, M., Eixarch, E., . . . Vanrell, J. (2006). Sequential changes in uterine artery blood flow pattern between the first and second trimesters of gestation in relation to pregnancy outcome. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology: The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 28(6), 802-808.
- Goodfellow, J., Bellamy, M. F., Gorman, S. T., Brownlee, M., Ramsey, M. W., Lewis, M. J., . . . Henderson, A. H. (1998). Endothelial function is impaired in fit young adults of low birth weight. *Cardiovascular research*, 40(3), 600-606.
- Granger, J. P., Alexander, B. T., Bennett, W. A., y Khalil, R. A. (2001). Pathophysiology of pregnancy-induced hypertension. *American journal of hypertension*, 14(S3), 178S-185S.
- Granger, J. P., Spradley, F. T., y Bakrania, B. A. (2018). The endothelin system: a critical player in the pathophysiology of preeclampsia. *Current hypertension reports*, 20(4), 1-8.

- Griffin, K. A., Kramer, H., y Bidani, A. K. (2008). Adverse renal consequences of obesity. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*.
- Gyselaers, W., y Peeters, L. (2013). Physiological implications of arteriovenous anastomoses and venous hemodynamic dysfunction in early gestational uterine circulation: a review. *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*, 26(9), 841-846.
- Gyselaers, W., Spaanderman, M., Hemodynamics, I. W. G. o. M., Bruckmann, A., Cockcroft, J., Cornette, J., . . . Ghossein-Doha, C. (2018). Assessment of venous hemodynamics and volume homeostasis during pregnancy: recommendations of the International Working Group on Maternal Hemodynamics. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 52(2), 174-185.
- Gyselaers, W., Vonck, S., Staelens, A. S., Lanssens, D., Tomsin, K., Oben, J., . . . Bruckers, L. (2019). Gestational hypertensive disorders show unique patterns of circulatory deterioration with ongoing pregnancy. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 316(3), R210-R221.
- Hammer, E. S., y Cipolla, M. J. (2005). Arterial wall hyperplasia is increased in placental compared with myoendometrial radial uterine arteries from late-pregnant rats. *American journal of obstetrics and gynecology*, 192(1), 302-308.
- Hayes, E. K., Lechowicz, A., Petrik, J. J., Storozhuk, Y., Paez-Parent, S., Dai, Q., . . . Holloway, A. C. (2012). Adverse fetal and neonatal outcomes associated with a life-long high fat diet: role of altered development of the placental vasculature. *PloS one*, 7(3), e33370.
- Heil, M., Eitenmüller, I., Schmitz-Rixen, T., y Schaper, W. (2006). Arteriogenesis versus angiogenesis: similarities and differences. *Journal of cellular and molecular medicine*, 10(1), 45-55.
- Helmreich, R. J., Hundley, V., y Varvel, P. (2008). The effect of obesity on heart rate (heart period) and physiologic parameters during pregnancy. *Biological research for nursing*, 10(1), 63-78.
- Hernandez-Andrade, E., Ahn, H., Szalai, G., Korzeniewski, S. J., Wang, B., King, M., . . . Romero, R. (2014). Evaluation of utero-placental and fetal hemodynamic parameters throughout gestation in pregnant mice using high-frequency ultrasound. *Ultrasound in medicine & biology*, 40(2), 351-360.

- Hill, C. C., y Pickinpaugh, J. (2008). Physiologic changes in pregnancy. *Surgical Clinics of North America*, 88(2), 391-401.
- Hostetter, T., Olson, J., Rennke, H., Venkatachalam, M., y Brenner, B. (1981). Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 241(1), F85-F93.
- Huang, L.-T., Hsieh, C.-S., Chang, K.-A., y Tain, Y.-L. (2012). Roles of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in pregnancy and fetal programming. *International journal of molecular sciences*, 13(11), 14606-14622.
- Hussein, W., y Lafayette, R. A. (2014). Renal function in normal and disordered pregnancy. *Current opinion in nephrology and hypertension*, 23(1), 46.
- Hyder, S. M., y Stancel, G. M. (1999). Regulation of angiogenic growth factors in the female reproductive tract by estrogens and progestins. *Molecular endocrinology*, 13(6), 806-811.
- Irons, D., Baylis, P., Butler, T., y Davison, J. (1997). Atrial natriuretic peptide in preeclampsia: metabolic clearance, sodium excretion and renal hemodynamics. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 273(3), F483-F487.
- James, J. L., Chamley, L. W., y Clark, A. R. (2017). Feeding your baby in utero: how the uteroplacental circulation impacts pregnancy. *Physiology*, 32(3), 234-245.
- Jansson, T., y Powell, T. L. (2007). Role of the placenta in fetal programming: underlying mechanisms and potential interventional approaches. *Clinical science*, 113(1), 1-13.
- Jern, S., Bergbrant, A., Björntorp, P., y Hansson, L. (1992). Relation of central hemodynamics to obesity and body fat distribution. *Hypertension*, 19(6\_pt\_1), 520-527.
- Jim, B., y Karumanchi, S. A. (2017). Preeclampsia: pathogenesis, prevention, and long-term complications. *Seminars in nephrology*,
- Kalenga, M., Thomas, K., De Gasparo, M., y De Hertogh, R. (1996). Determination of renin, angiotensin converting enzyme and angiotensin II levels in human placenta, chorion and amnion from women with pregnancy induced hypertension. *Clinical endocrinology*, 44(4), 429-433.
- Kassab, S., Miller, M. T., Hester, R., Novak, J., y Granger, J. P. (1998). Systemic hemodynamics and regional blood flow during chronic nitric oxide synthesis inhibition in pregnant rats. *Hypertension*, 31(1), 315-320.

- Keelan, J., Blumenstein, M., Helliwell, R., Sato, T., Marvin, K., y Mitchell, M. (2003). Cytokines, prostaglandins and parturition—a review. *Placenta*, 24, S33-S46.
- Khalil, A., y Hardman, L. (2015). The role of arginine, homoarginine and nitric oxide in pregnancy. *Amino acids*, 47(9), 1715-1727.
- Khankin, E. V., Hacker, M. R., Zelop, C. M., Karumanchi, S. A., y Rana, S. (2012). Intravital high-frequency ultrasonography to evaluate cardiovascular and uteroplacental blood flow in mouse pregnancy. *Pregnancy Hypertension: An International Journal of Women's Cardiovascular Health*, 2(2), 84-92.
- Khong, S. L., Kane, S. C., Brennecke, S. P., y da Silva Costa, F. (2015). First-trimester uterine artery Doppler analysis in the prediction of later pregnancy complications. *Disease markers*, 2015.
- Kim, Y. H., Lee, H. J., Shin, J. E., Lee, Y., Shin, J. C., Park, T. C., y Park, I. Y. (2015). The predictive value of the uterine artery pulsatility index during the early third trimester for the occurrence of adverse pregnancy outcomes depending on the maternal obesity. *Obesity research & clinical practice*, 9(4), 374-381.
- Koleganova, N., Benz, K., Piecha, G., Ritz, E., y Amann, K. (2012). Renal, cardiovascular and metabolic effects of fetal programming. *Nephrology dialysis transplantation*, 27(8), 3003-3007.
- Kone, B. C., y Baylis, C. (1997). Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 272(5), F561-F578.
- Konje, J. C., Kaufmann, P., Bell, S. C., y Taylor, D. J. (2001). A longitudinal study of quantitative uterine blood flow with the use of color power angiography in appropriate for gestational age pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology*, 185(3), 608-613.
- Kreiser, D., Kelly, D. K., Seidman, D. S., Stevenson, D. K., Baum, M., y Dennery, P. A. (2003). Gestational pattern of heme oxygenase expression in the rat. *Pediatric research*, 54(2), 172-178.
- Kulandavelu, S., Qu, D., y Adamson, S. L. (2006). Cardiovascular function in mice during normal pregnancy and in the absence of endothelial NO synthase. *Hypertension*, 47(6), 1175-1182.
- Kwon, E. J., y Kim, Y. J. (2017). What is fetal programming?: a lifetime health is under the control of in utero health. *Obstetrics & gynecology science*, 60(6), 506-519.



- Lafayette, R. A., Druzin, M., Sibley, R., Derby, G., Malik, T., Huie, P., . . . Myers, B. D. (1998). Nature of glomerular dysfunction in pre-eclampsia. *Kidney international*, 54(4), 1240-1249.
- Lafayette, R. A., Malik, T., Druzin, M., Derby, G., y Myers, B. D. (1999). The dynamics of glomerular filtration after Caesarean section. *Journal of the American Society of Nephrology*, 10(7), 1561-1565.
- Lee, A. J., Cohn, J. H., y Ranasinghe, J. S. (2011). Cardiac output assessed by invasive and minimally invasive techniques. *Anesthesiology research and practice*, 2011.
- Leeson, C., Kattenhorn, M., Morley, R., Lucas, A., y Deanfield, J. (2001). Impact of low birth weight and cardiovascular risk factors on endothelial function in early adult life. *Circulation*, 103(9), 1264-1268.
- Leiva, A., Fuenzalida, B., Barros, E., Sobrevia, B., Salsoso, R., Saez, T., . . . Toledo, F. (2016). Nitric oxide is a central common metabolite in vascular dysfunction associated with diseases of human pregnancy. *Current vascular pharmacology*, 14(3), 237-259.
- Lewandowska, M., Więckowska, B., Sajdak, S., y Lubiński, J. (2020). Pre-pregnancy obesity vs. other risk factors in probability models of preeclampsia and gestational hypertension. *Nutrients*, 12(9), 2681.
- Lichton, I. J., y Hugh, J. E. (1968). Renal clearance of water and solutes by pregnant rats treated with spironolactone. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 129(1), 312-315.
- Linke, A., Li, W., Huang, H., Wang, Z., y Hintze, T. H. (2002). Role of cardiac eNOS expression during pregnancy in the coupling of myocardial oxygen consumption to cardiac work. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 283(3), H1208-H1214.
- Linke, N., Schumacher, A., Woidacki, K., Croy, B. A., y Zenclussen, A. C. (2014). Carbon monoxide promotes proliferation of uterine natural killer cells and remodeling of spiral arteries in pregnant hypertensive heme oxygenase-1 mutant mice. *Hypertension*, 63(3), 580-588.
- Lis, C. B., Suto, T., y Conrad, K. (1996). Importance of nitric oxide in control of systemic and renal hemodynamics during normal pregnancy: studies in the rat and implications for preeclampsia. *Hypertension in pregnancy*, 15(2), 147-169.

- Lodhi, R. S., Nakabayashi, K., Suzuki, K., Yamada, A. Y., Hazama, R., Ebina, Y., y Yamada, H. (2013). Relaxin has anti-apoptotic effects on human trophoblast-derived HTR-8/SV neo cells. *Gynecological Endocrinology*, 29(12), 1051-1054.
- Loria, A., Reverte, V., Salazar, F., Saez, F., Llinas, M. T., y Salazar, F. J. (2007a). Changes in renal hemodynamics and excretory function induced by a reduction of ANG II effects during renal development. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.
- Loria, A., Reverte, V., Salazar, F., Saez, F., Llinas, M. T., y Salazar, F. J. (2007b). Sex and age differences of renal function in rats with reduced ANG II activity during the nephrogenic period. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 293(2), F506-F510.
- Losordo, D. W., y Isner, J. M. (2001). Estrogen and angiogenesis: a review. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 21(1), 6-12.
- Lumbers, E. R., Kandasamy, Y., Delforce, S. J., Boyce, A. C., Gibson, K. J., y Pringle, K. G. (2020). Programming of renal development and chronic disease in adult life. *Frontiers in physiology*, 11, 757.
- Luyckx, V. A., y Brenner, B. M. (2020). Clinical consequences of developmental programming of low nephron number. *The Anatomical Record*, 303(10), 2613-2631.
- Lyall, F., Barber, A., Myatt, L., Bulmer, J. N., y Robson, S. C. (2000). Hemeoxygenase expression in human placenta and placental bed implies a role in regulation of trophoblast invasion and placental function. *The FASEB Journal*, 14(1), 208-219.
- Lyall, F., Robson, S. C., y Bulmer, J. N. (2013). Spiral artery remodeling and trophoblast invasion in preeclampsia and fetal growth restriction: relationship to clinical outcome. *Hypertension*, 62(6), 1046-1054.
- Llinás, M. T., Alexander, B. T., Capparelli, M. F., Carroll, M. A., y Granger, J. P. (2004). Cytochrome P-450 inhibition attenuates hypertension induced by reductions in uterine perfusion pressure in pregnant rats. *Hypertension*, 43(3), 623-628.
- Lloyd-Davies, C., Collins, S. L., y Burton, G. J. (2021). Understanding the uterine artery Doppler waveform and its relationship to spiral artery remodelling. *Placenta*, 105, 78-84.
- Madsen, K. M., Neerhof, M. G., Wessale, J. L., y Thaete, L. G. (2001). Influence of ET B receptor antagonism on pregnancy outcome in rats. *The Journal of the Society for Gynecologic Investigation: JSGI*, 8(4), 239-244.

- Mäkikallio, K., Tekay, A., y Jouppila, P. (2004). Uteroplacental hemodynamics during early human pregnancy: a longitudinal study. *Gynecologic and obstetric investigation*, 58(1), 49-54.
- Marshall, S. A., Ng, L., Unemori, E. N., Girling, J. E., y Parry, L. J. (2016). Relaxin deficiency results in increased expression of angiogenesis-and remodelling-related genes in the uterus of early pregnant mice but does not affect endometrial angiogenesis prior to implantation. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 14(1), 1-14.
- Matthews, B., y Taylor, D. (1960). Effects of pregnancy on inulin and para-aminohippurate clearances in the anaesthetized rat. *The Journal of Physiology*, 151(2), 385.
- Maul, H., Longo, M., Saade, G., y Garfield, R. (2003). Nitric oxide and its role during pregnancy: from ovulation to delivery. *Current pharmaceutical design*, 9(5), 359-380.
- Mazzuca, M. Q., Dang, Y., y Khalil, R. A. (2013). Enhanced endothelin receptor type B-mediated vasodilation and underlying  $[Ca^{2+}]_i$  in mesenteric microvessels of pregnant rats. *British journal of pharmacology*, 169(6), 1335-1351.
- McCaig, D., y Lyall, F. (2009). Inhibitors of heme oxygenase reduce invasion of human primary cytotrophoblast cells in vitro. *Placenta*, 30(6), 536-538.
- McGeary, R. P., Szyzew, A. J., y Toth, I. (2003). Biological properties and therapeutic potential of bilirubin. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 3(3), 253-256.
- Melchiorre, K., Sharma, R., y Thilaganathan, B. (2012). Cardiac structure and function in normal pregnancy. *Current Opinion in Obstetrics and Gynecology*, 24(6), 413-421.
- Metcalf, J., Romney, S. L., Ramsey, L. H., Reid, D. E., y Burwell, C. S. (1955). Estimation of uterine blood flow in normal human pregnancy at term. *The Journal of clinical investigation*, 34(11), 1632-1638.
- Milne, J., Lindheimer, M., y Davison, J. (2002). Glomerular heteroporous membrane modeling in third trimester and postpartum before and during amino acid infusion. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 282(1), F170-F175.
- Miller, C. N., Kodavanti, U. P., Stewart, E. J., Schaldweiler, M., Richards, J. H., Ledbetter, A. D., . . . Farraj, A. K. (2019). Aspirin pre-treatment modulates ozone-induced fetal growth restriction and alterations in uterine blood flow in rats. *Reproductive Toxicology*, 83, 63-72.

- Mishra, K., Datta, V., Aarushi, A., Narula, M. K., Iyer, R. S., y Nangia, S. (2014). The association between weight for gestational age and kidney volume: a study in newborns in India. *Iranian journal of pediatrics*, 24(1), 93.
- Mitchell, M., Kraemer, D., y Strickland, D. (1982). The human placenta: a major source of prostaglandin D2. *Prostaglandins, Leukotrienes and Medicine*, 8(4), 383-387.
- Mitsnefes, M. M., Khoury, P., y McEnery, P. T. (2002). Body mass index and allograft function in pediatric renal transplantation. *Pediatric nephrology*, 17(7), 535-539.
- Mone, S. M., Sanders, S. P., y Colan, S. D. (1996). Control mechanisms for physiological hypertrophy of pregnancy. *Circulation*, 94(4), 667-672.
- Moreno, J. M., Martinez, C. M., de Jodar, C., Reverte, V., Bernabé, A., Salazar, F. J., y Llinás, M. T. (2021). Gender differences in the renal changes induced by a prolonged high-fat diet in rats with altered renal development. *Journal of physiology and biochemistry*, 77(3), 431-441.
- Moreno, J. M., Tapia, A., Martinez, C. M., Reverte, V., Oltra, L., Llinas, M. T., y Salazar, F. J. (2019). Sex-dependent differences in the adverse renal changes induced by an early in life exposure to a high-fat diet. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 316(2), F332-F340.
- Mu, J., y Adamson, S. L. (2006). Developmental changes in hemodynamics of uterine artery, utero-and umbilicoplacental, and vitelline circulations in mouse throughout gestation. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 291(3), H1421-H1428.
- Mu, M., Wang, S.-F., Sheng, J., Zhao, Y., Li, H.-Z., Hu, C.-L., y Tao, F.-B. (2012). Birth weight and subsequent blood pressure: a meta-analysis. *Archives of cardiovascular diseases*, 105(2), 99-113.
- Napso, T., Yong, H. E., Lopez-Tello, J., y Sferruzzi-Perri, A. N. (2018). The role of placental hormones in mediating maternal adaptations to support pregnancy and lactation. *Frontiers in physiology*, 9, 1091.
- Neeland, I. J., Gupta, S., Ayers, C. R., Turer, A. T., Rame, J. E., Das, S. R., . . . Vega, G. L. (2013). Relation of regional fat distribution to left ventricular structure and function. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 6(5), 800-807.
- Nielsen, A., Schausser, K., y Poulsen, K. (2000). Current topic: the uteroplacental renin-angiotensin system. *Placenta*, 21(5-6), 468-477.

- Novak, J., Danielson, L., Kerchner, L., Sherwood, O., Ramirez, R., Moalli, P., y Conrad, K. (2001). Relaxin is essential for renal vasodilation during pregnancy in conscious rats. *The Journal of clinical investigation*, 107(11), 1469-1475.
- Nyberg, P., Xie, L., y Kalluri, R. (2005). Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer research*, 65(10), 3967-3979.
- Odutayo, A., y Hladunewich, M. (2012). Obstetric nephrology: renal hemodynamic and metabolic physiology in normal pregnancy. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, 7(12), 2073-2080.
- Ojeda, N. B., Grigore, D., y Alexander, B. T. (2008). Intrauterine growth restriction: fetal programming of hypertension and kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*, 15(2), 101-106.
- Ong, S. S., Baker, P. N., Mayhew, T. M., y Dunn, W. R. (2005). Remodeling of myometrial radial arteries in preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 192(2), 572-579.
- Osol, G., Ko, N. L., y Mandalà, M. (2019). Plasticity of the maternal vasculature during pregnancy. *Annual review of physiology*, 81, 89-111.
- Osol, G., y Mandala, M. (2009). Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Physiology*, 24(1), 58-71.
- Osol, G., y Moore, L. G. (2014). Maternal uterine vascular remodeling during pregnancy. *Microcirculation*, 21(1), 38-47.
- Otero-Naveiro, A., Gómez-Fernández, C., Álvarez-Fernández, R., Pérez-López, M., y Paz-Fernández, E. (2021). Maternal and fetal outcomes during pregnancy and puerperium in obese and overweight pregnant women. A cohort study. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 304(5), 1205-1212.
- Panaitescu, A. M., Akolekar, R., Kametas, N., Syngelaki, A., y Nicolaidis, K. H. (2017). Impaired placentation in women with chronic hypertension who develop preeclampsia. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 50(4), 496-500.
- Pastore, M. B., Jobe, S. O., Ramadoss, J., y Magness, R. R. (2012). Estrogen receptor- $\alpha$  and estrogen receptor- $\beta$  in the uterine vascular endothelium during pregnancy: functional implications for regulating uterine blood flow. *Seminars in reproductive medicine*,
- Paul, M., Wagner, J., y Dzau, V. J. (1993). Gene expression of the renin-angiotensin system in human tissues. Quantitative analysis by the polymerase chain reaction. *The Journal of clinical investigation*, 91(5), 2058-2064.

- Perälä, M.-M., Moltchanova, E., Kaartinen, N. E., Männistö, S., Kajantie, E., Osmond, C., . . . Eriksson, J. G. (2011). The association between salt intake and adult systolic blood pressure is modified by birth weight. *The American journal of clinical nutrition*, 93(2), 422-426.
- Père, M.-C., y Etienne, M. (2000). Uterine blood flow in sows: effects of pregnancy stage and litter size. *Reproduction Nutrition Development*, 40(4), 369-382.
- Phillips, R. J., Fortier, M. A., y Bernal, A. L. (2014). Prostaglandin pathway gene expression in human placenta, amnion and choriodecidua is differentially affected by preterm and term labour and by uterine inflammation. *BMC pregnancy and childbirth*, 14(1), 1-14.
- Pijnenborg, R., Vercruyssen, L., y Brosens, I. (2011). Deep placentation. *Best practice & research Clinical obstetrics & gynaecology*, 25(3), 273-285.
- Pisani, I., Tiralongo, G., Presti, D. L., Gagliardi, G., Farsetti, D., Vasapollo, B., . . . Valensise, H. (2017). Correlation between maternal body composition and haemodynamic changes in pregnancy: different profiles for different hypertensive disorders. *Pregnancy hypertension*, 10, 131-134.
- Poladia, D. P., Kish, K., Kutay, B., Bauer, J., Baum, M., y Bates, C. M. (2006). Link between reduced nephron number and hypertension: studies in a mutant mouse model. *Pediatric research*, 59(4), 489-493.
- Prefumo, F., Sebire, N., y Thilaganathan, B. (2004). Decreased endovascular trophoblast invasion in first trimester pregnancies with high-resistance uterine artery Doppler indices. *Human Reproduction*, 19(1), 206-209.
- Rasmussen, S., y Irgens, L. M. (2007). Pregnancy-induced hypertension in women who were born small. *Hypertension*, 49(4), 806-812.
- Redman, C., Sargent, I., y Staff, A. (2014). IFPA Senior Award Lecture: making sense of pre-eclampsia—two placental causes of preeclampsia? *Placenta*, 35, S20-S25.
- Redon, J., y Lurbe, E. (2015). The kidney in obesity. *Current hypertension reports*, 17(6), 1-9.
- Reichetzedler, C. (2021). Overweight and obesity in pregnancy: their impact on epigenetics. *European journal of clinical nutrition*, 75(12), 1710-1722.
- Rekonen, A., Luotola, H., Pltkänen, M., Kuikka, J., y Pyörälä, T. (1976). Measurement of intervillous and myometrial blood flow by an intravenous <sup>133</sup>Xe method. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 83(9), 723-728.

- Rennie, M. Y., Whiteley, K. J., Adamson, S. L., y Sled, J. G. (2016). Quantification of gestational changes in the uteroplacental vascular tree reveals vessel specific hemodynamic roles during pregnancy in mice. *Biology of reproduction*, 95(2), 43, 41-49.
- Reverte, V., Tapia, A., Baile, G., Gambini, J., Gíménez, I., Llinas, M. T., y Salazar, F. J. (2013). Role of angiotensin II in arterial pressure and renal hemodynamics in rats with altered renal development: age-and sex-dependent differences. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 304(1), F33-F40.
- Roberts, M., Lindheimer, M., y Davison, J. M. (1996). Altered glomerular permselectivity to neutral dextrans and heteroporous membrane modeling in human pregnancy. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 270(2), F338-F343.
- Rosenfeld, C. R., Cox, B. E., Roy, T., y Magness, R. R. (1996). Nitric oxide contributes to estrogen-induced vasodilation of the ovine uterine circulation. *The Journal of clinical investigation*, 98(9), 2158-2166.
- Saarelainen, H. (2012). *Endothelial function and regulation of vascular tone in normal and complicated pregnancies* [Itä-Suomen yliopisto].
- Saez, F., Castells, M. T., Zuasti, A., Salazar, F., Reverte, V., Loria, A., y Salazar, F. J. (2007). Sex differences in the renal changes elicited by angiotensin II blockade during the nephrogenic period. *Hypertension*, 49(6), 1429-1435.
- Salati, J. A., Roberts, V. H., Schabel, M. C., Lo, J. O., Kroenke, C. D., Lewandowski, K. S., . . . Frias, A. E. (2019). Maternal high-fat diet reversal improves placental hemodynamics in a nonhuman primate model of diet-induced obesity. *International Journal of Obesity*, 43(4), 906-916.
- Salazar, F., Reverte, V., Saez, F., Loria, A., Llinas, M. T., y Salazar, F. J. (2008). Age- and sodium-sensitive hypertension and sex-dependent renal changes in rats with a reduced nephron number. *Hypertension*, 51(4), 1184-1189.
- Saleh, L., Verdonk, K., Visser, W., van den Meiracker, A. H., y Danser, A. J. (2016). The emerging role of endothelin-1 in the pathogenesis of pre-eclampsia. *Therapeutic advances in cardiovascular disease*, 10(5), 282-293.
- Sanghavi, M., y Rutherford, J. D. (2014). Cardiovascular physiology of pregnancy. *Circulation*, 130(12), 1003-1008.

- Sarno, L., Morlando, M., Giudicepietro, A., Carlea, A., Sidhu, S., Campanile, M., . . . Guida, M. (2020). The impact of obesity on haemodynamic profiles of pregnant women beyond 34 weeks' gestation. *Pregnancy hypertension*, 22, 191-195.
- Savu, O., Jurcuț, R., Giușcă, S., Van Mieghem, T., Gussi, I., Popescu, B. A., . . . Voigt, J.-U. (2012). Morphological and functional adaptation of the maternal heart during pregnancy. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 5(3), 289-297.
- Schiffer, V., Evers, L., de Haas, S., Ghossein-Doha, C., Al-Nasiry, S., y Spaanderman, M. (2020). Spiral artery blood flow during pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *BMC pregnancy and childbirth*, 20(1), 1-15.
- Schlabritz-Loutsevitch, N., Apostolakis-Kyrus, K., Krutilina, R., Hubbard, G., Kocak, M., Janjetovic, Z., . . . Dick Jr, E. (2016). Pregnancy-driven cardiovascular maternal miR-29 plasticity in obesity. *Journal of medical primatology*, 45(6), 297-303.
- Sharma, N., Jayashree, K., y Nadhamuni, K. (2018). Maternal history and uterine artery wave form in the prediction of early-onset and late-onset preeclampsia: A cohort study. *International Journal of Reproductive Biomedicine*, 16(2), 109.
- Shibuya, M. (2011). Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor (VEGFR) signaling in angiogenesis: a crucial target for anti-and pro-angiogenic therapies. *Genes & cancer*, 2(12), 1097-1105.
- Silasi, M., Cohen, B., Karumanchi, S. A., y Rana, S. (2010). Abnormal placentation, angiogenic factors, and the pathogenesis of preeclampsia. *Obstetrics and Gynecology Clinics*, 37(2), 239-253.
- Sims, E. A., y Krantz, K. E. (1958). Serial studies of renal function during pregnancy and the puerperium in normal women. *The Journal of clinical investigation*, 37(12), 1764-1774.
- Skinner, S., Lumbers, E. R., y Symonds, E. (1968). Renin concentration in human fetal and maternal tissues. *American journal of obstetrics and gynecology*, 101(4), 529-533.
- Slangen, B., Out, I., Verkeste, C. M., y Peeters, L. (1996). Hemodynamic changes in early pregnancy in chronically instrumented, conscious rats. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 270(5), H1779-H1784.
- Soma-Pillay, P., Nelson-Piercy, C., Tolppanen, H., y Mebazaa, A. (2016). Physiological changes in pregnancy: review articles. *Cardiovascular journal of Africa*, 27(2), 89-94.



- South, A. M., Nixon, P. A., Chappell, M. C., Diz, D. I., Russell, G. B., Shaltout, H. A., . . . Washburn, L. K. (2019). Obesity is associated with higher blood pressure and higher levels of angiotensin II but lower angiotensin-(1-7) in adolescents born preterm. *The Journal of pediatrics*, 205, 55-60. e51.
- Spradley, F. T., Palei, A. C., y Granger, J. P. (2015). Increased risk for the development of preeclampsia in obese pregnancies: weighing in on the mechanisms. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 309(11), R1326-R1343.
- Stillman, I. E., y Karumanchi, S. A. (2007). The glomerular injury of preeclampsia. *Journal of the American Society of Nephrology*, 18(8), 2281-2284.
- Stockand, J. D., y Sansom, S. C. (1998). Glomerular mesangial cells: electrophysiology and regulation of contraction. *Physiological reviews*, 78(3), 723-744.
- Stuttfield, E., y Ballmer-Hofer, K. (2009). Structure and function of VEGF receptors. *IUBMB life*, 61(9), 915-922.
- Sutton, E. F., Gemmel, M., y Powers, R. W. (2020). Nitric oxide signaling in pregnancy and preeclampsia. *Nitric Oxide*, 95, 55-62.
- Tachibana, M., Hashino, M., Nishida, T., Shimizu, T., y Watarai, M. (2011). Protective role of heme oxygenase-1 in *Listeria monocytogenes*-induced abortion. *PloS one*, 6(9), e25046.
- Tachibana, M., Watanabe, K., Yamasaki, Y., Suzuki, H., y Watarai, M. (2008). Expression of heme oxygenase-1 is associated with abortion caused by *Brucella abortus* infection in pregnant mice. *Microbial pathogenesis*, 45(2), 105-109.
- Taylor, R. N., Roberts, J. M., Cunningham, G. F., y Lindheimer, M. D. (2014). *Chesley's hypertensive disorders in pregnancy*. Elsevier.
- Tkachenko, O., Shchekochikhin, D., y Schrier, R. W. (2014). Hormones and hemodynamics in pregnancy. *International journal of endocrinology and metabolism*, 12(2).
- Torgersen, C. K. L., y Curran, C. A. (2006). A systematic approach to the physiologic adaptations of pregnancy. *Critical care nursing quarterly*, 29(1), 2-19.
- Troisi, R., Braekke, K., Harsem, N. K., Hyer, M., Hoover, R. N., y Staff, A. C. (2008). Blood pressure augmentation and maternal circulating concentrations of angiogenic factors at delivery in preeclamptic and uncomplicated pregnancies. *American journal of obstetrics and gynecology*, 199(6), 653. e651-653. e610.

- Tsujimoto, Y., Kataoka, Y., Banno, M., Taito, S., Kokubo, M., Masuzawa, Y., y Yamamoto, Y. (2022). Association of low birthweight and premature birth with hypertensive disorders in pregnancy: a systematic review and meta-analysis. *Journal of hypertension*, 40(2), 205-212.
- Valensise, H., Vasapollo, B., Gagliardi, G., y Novelli, G. P. (2008). Early and late preeclampsia: two different maternal hemodynamic states in the latent phase of the disease. *Hypertension*, 52(5), 873-880.
- van Drongelen, J., de Vries, R., Lotgering, F. K., Smits, P., y Spaanderman, M. E. (2014). Functional vascular changes of the kidney during pregnancy in animals: A systematic review and meta-analysis. *PloS one*, 9(11), e112084.
- Vaz-Silva, J., Carneiro, M., Ferreira, M., Pinheiro, S., Silva, D., Silva, A., . . . Reis, F. (2009). The vasoactive peptide angiotensin-(1-7), its receptor Mas and the angiotensin-converting enzyme type 2 are expressed in the human endometrium. *Reproductive Sciences*, 16(3), 247-256.
- Veille, J.-C., y Hanson, R. (1994). Obesity, pregnancy, and left ventricular functioning during the third trimester. *American journal of obstetrics and gynecology*, 171(4), 980-983.
- Verburg, B. O., Geelhoed, J., Steegers, E., Hofman, A., Moll, H., Witteman, J., y Jaddoe, V. (2007). Fetal kidney volume and its association with growth and blood flow in fetal life: The Generation R Study. *Kidney international*, 72(6), 754-761.
- Verkeste, C. M., Slangen, B. F., Dubelaar, M.-L., Van Kreel, B. K., y Peeters, L. L. (1998). Mechanism of volume adaptation in the awake early pregnant rat. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 274(5), H1662-H1666.
- Verlohren, S., Galindo, A., Schlembach, D., Zeisler, H., Herraiz, I., Moertl, M. G., . . . Stepan, H. (2010). An automated method for the determination of the sFlt-1/PIGF ratio in the assessment of preeclampsia. *American journal of obstetrics and gynecology*, 202(2), 161. e161-161. e111.
- Verlohren, S., Geusens, N., Morton, J., Verhaegen, I., Hering, L., Herse, F., . . . Cartwright, J. E. (2010). Inhibition of trophoblast-induced spiral artery remodeling reduces placental perfusion in rat pregnancy. *Hypertension*, 56(2), 304-310.

- Vinayagam, D., Gutierrez, J., Binder, J., Mantovani, E., Thilaganathan, B., y Khalil, A. (2017). Impaired maternal hemodynamics in morbidly obese women: a case-control study. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology*, 50(6), 761-765.
- Vonck, S., Lanssens, D., Staelens, A. S., Tomsin, K., Oben, J., Bruckers, L., y Gyselaers, W. (2019). Obesity in pregnancy causes a volume overload in third trimester. *European journal of clinical investigation*, 49(11), e13173.
- Wallace, J., Milne, J., Matsuzaki, M., y Aitken, R. (2008). Serial measurement of uterine blood flow from mid to late gestation in growth restricted pregnancies induced by overnourishing adolescent sheep dams. *Placenta*, 29(8), 718-724.
- Wang, Y., Chen, X., Klag, M. J., y Caballero, B. (2006). Epidemic of childhood obesity: implications for kidney disease. *Advances in chronic kidney disease*, 13(4), 336-351.
- Whitley, G. S. J., y Cartwright, J. (2010). Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta*, 31(6), 465-474.
- Wong, A. Y., Kulandavelu, S., Whiteley, K. J., Qu, D., Langille, B. L., y Adamson, S. L. (2002). Maternal cardiovascular changes during pregnancy and postpartum in mice. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 282(3), H918-H925.
- Wu, L., y Wang, R. (2005). Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacological reviews*, 57(4), 585-630.
- Yamaleyeva, L., Neves, L., Coveleskie, K., Diz, D., Gallagher, P., y Brosnihan, K. (2013). AT1, AT2, and AT1-7 receptor expression in the uteroplacental unit of normotensive and hypertensive rats during early and late pregnancy. *Placenta*, 34(6), 497-502.
- Yoder, S. R., Thornburg, L. L., y Bisognano, J. D. (2009). Hypertension in pregnancy and women of childbearing age. *The American journal of medicine*, 122(10), 890-895.
- Yu, C., Teoh, T., y Robinson, S. (2006). Obesity in pregnancy. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 113(10), 1117-1125.
- Zenclussen, A., Joachim, R., Hagen, E., Peiser, C., Klapp, B., y Arck, P. (2002). Heme oxygenase is downregulated in stress-triggered and interleukin-12-mediated murine abortion. *Scandinavian journal of immunology*, 55(6), 560-569.

- Zenclussen, A., Lim, E., Knoeller, S., Knackstedt, M., Hertwig, K., Hagen, E., . . . Arck, P. (2003). Heme oxygenases in pregnancy II: HO-2 is downregulated in human pathologic pregnancies. *American journal of reproductive immunology*, 50(1), 66-76.
- Zenclussen, M. L., Casalis, P. A., El-Mousleh, T., Rebelo, S., Langwisch, S., Linzke, N., . . . Zenclussen, A. C. (2011). Haem oxygenase-1 dictates intrauterine fetal survival in mice via carbon monoxide. *The Journal of pathology*, 225(2), 293-304.
- Zhao, H., Azuma, J., Kalish, F., Wong, R. J., y Stevenson, D. K. (2011). Maternal heme oxygenase 1 regulates placental vasculature development via angiogenic factors in mice. *Biology of reproduction*, 85(5), 1005-1012.
- Zullino, S., Buzzella, F., y Simoncini, T. (2018). Nitric oxide and the biology of pregnancy. *Vascular pharmacology*, 110, 71-74.