

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Fisiología



**INFLUENCIA DE INTERVENCIONES NUTRICIONALES
DURANTE LA GESTACIÓN SOBRE EL DESARROLLO
FETAL EN LA RATA. PAPEL DEL ESTRÉS OXIDATIVO
DE LA PLACENTA**

TESIS DOCTORAL

Cynthia Guadalupe Reyes Hernández

2018

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Universidad Autónoma de Madrid. Financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y el Gobierno del Estado de Nuevo León a través del Instituto de Innovación y Transferencia de Tecnología (I2T2) de México y por el Ministerio de Economía y Competitividad de España en su convocatoria del Plan Nacional (FEM2015-63631-R) cofinanciado con fondos FEDER.

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMIENTOS

Hoy, después de cuatro años (que se pasaron volando), se concluye una etapa en mi vida. Antes de empezar, quisiera agradecer a las personas que lo han hecho posible.

Gracias papá y mamá por ser mi todo. Por siempre desear lo mejor para Ale y para mí y por hacer de todo para que nada nos falte. Gracias por ser los mejores papás se pueden tener, por apoyar nuestros sueños y estar siempre a nuestro lado. Esto es por y para ustedes.

Gracias Ale, por ser la mejor hermana, por cuidarme desde pequeña y aguantarme siempre. Gracias por ser un ejemplo para mí.

Gracias Matteo, perché ogni giorno rendi la mia vita più bella. Per farmi sorridere tutto il tempo e farmi sentire come se fossi a casa.

Gracias Dr. Rodrigo, mi director de tesis, por haberme hecho conocer el mundo de la investigación, por apoyarme y ser parte de mi vida académica desde hace 12 años.

Gracias Silvia, y Ángel Luis, mis directores de tesis, por todo el apoyo que me han dado desde que llegué a su laboratorio, por todo lo que me han enseñado, por sus consejos y su paciencia.

Gracias a Maricarmen, por siempre tener ese entusiasmo, por venir y acompañarnos los fines de semana de experimentos y por enseñarme muchas cosas.

Gracias Profesor Regadera, por ser el enlace con la UANL y haberme permitido venir a la UAM, por sus consejos y su apoyo durante este tiempo.

Gracias Marta y Raquel por apoyarme con los experimentos de WB.

Gracias Manu, Luca y Sonia, por estos meses en el laboratorio PCare, por enseñarme mucho y hacerme sentir muy cómoda con ustedes.

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

Gracias César, David, José Luis, Pilar, Perla y Sara. Gracias por ser mi familia, por escucharme, aguantarme y ayudarme. Gracias por hacer mi vida más fácil estando lejos de casa.

Gracias Ruth, Tha, Ale, Toño y Felipe, porque a pesar de estar lejos siempre han estado para mí, apoyándome y dándome ánimos. Gracias por esas llamadas y esos mensajes a deshoras.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
RESUMEN / ABSTRACT	16
INTRODUCCIÓN	21
1. Programación fetal	22
1.1 Factores adversos que participan en la programación fetal.....	24
1.2 Modelos experimentales para el estudio de la programación fetal.....	26
1.3 Dimorfismo sexual en la programación fetal.....	28
1.4 Mecanismos implicados en la programación fetal.....	29
1.4.1 Alteraciones orgánicas.....	29
1.4.2 Cambios epigenéticos.....	31
1.4.3 Estrés oxidativo.....	32
2. La gestación	36
2.1 La placenta.....	37
2.2 Patrones de gestación en la actualidad y peso al nacer.....	38
2.3 Complicaciones obstétricas.....	39
2.3.1 Preeclampsia.....	39
2.3.2 Diabetes gestacional.....	40
2.4 Complicaciones fetales y peso al nacer.....	41
2.4.1 Prematuridad.....	41
2.4.2 Restricción del crecimiento intrauterino.....	41
3. Nutrición en el embarazo	43
3.1 Requerimientos nutricionales en el embarazo.....	43
3.2 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.....	44
3.2.1 Síntesis de LCPUFA ω 3 y ω 6.....	44
3.2.2 Funciones de los LCPUFA.....	45
3.2.3 Transferencia de LCPUFA a través de la placenta.....	46
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	48
MATERIAL Y MÉTODOS	51
1. Modelos experimentales	52
2. Diseño experimental	55
3. Métodos experimentales	57
3.1 Medidas corporales.....	57
3.2 Procesamiento de muestras de sangre.....	57
3.3 Procesamiento de tejido placentario.....	57
3.4 Determinación de proteínas en plasma y placenta.....	58

3.5 Niveles plasmáticos de corticosterona.....	58
3.6 Medidas de parámetros de estrés oxidativo.....	59
3.6.1 Actividad superóxido dismutasa (SOD)	59
3.6.2 Actividad catalasa.....	60
3.6.3 Glutacion reducido (GSH)	61
3.6.4 Grupos tioles.....	62
3.6.5 Peroxidación lipídica.....	63
3.6.6 Proteínas carboniladas.....	64
3.7 Estudio de la expresión de proteínas mediante Western Blot en placenta.....	65
3.7.1 Procesamiento de las muestras de tejido placentario.....	65
3.7.2 Detección de proteínas por Western Blot.....	66
3.8 Medición de LCPUFA en plasma y placenta.....	68
3.8.1 Procesamiento de las muestras de tejido placentario.....	68
3.8.2 Extracción de lípidos del plasma y de la placenta.....	69
3.9 Determinación del factor de crecimiento placentario en la placenta.....	70
4. Análisis estadístico.....	71
RESULTADOS.....	73
I. RESTRICCIÓN NUTRICIONAL EN LA GESTACIÓN.....	74
1. Parámetros de las ratas gestantes.....	74
1.1 Peso.....	74
1.2 Macronutrientes en plasma.....	74
1.3 Corticosterona plasmática.....	76
1.4 Biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo.....	76
1.4.1 Antioxidantes.....	76
1.4.2 Daño oxidativo.....	77
2. Parámetros placentarios.....	78
2.1 Peso.....	78
2.2 Macronutrientes en la placenta.....	79
2.3 Biomarcadores de estrés oxidativo en la placenta.....	80
2.3.1 Daño oxidativo	80
2.3.2 Expresión de enzimas productoras de radicales libres.....	81
2.3.3 Expresión de enzimas eliminadoras de radicales libres.....	82
2.4 Factor de crecimiento placentario.....	83
3. Parámetros fetales.....	83
3.1 Peso y longitud.....	83
3.2 Peso de órganos.....	84
3.3 Corticosterona plasmática.....	85
II. SUPLEMENTACIÓN CON ARA+DHA DURANTE LA GESTACIÓN.....	86
1. Parámetros de las ratas gestantes.....	86
1.1 Ingesta.....	86

1.2 Peso.....	86
1.3 Macronutrientes en plasma.....	87
1.4 Corticosterona plasmática.....	89
1.5 Biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo.....	90
1.5.1 Antioxidantes.....	90
1.5.2 Daño oxidativo.....	91
2. Parámetros placentarios.....	91
2.1 Peso.....	91
2.2 Macronutrientes en la placenta.....	92
2.3 Biomarcadores de estrés oxidativo en la placenta.....	94
3. Parámetros fetales.....	95
3.1 Peso y longitud.....	95
3.2 Peso de órganos.....	96
3.3 Corticosterona plasmática.....	97
DISCUSIÓN.....	98
1. Efecto de la desnutrición materna durante la gestación.....	99
2. Efecto de la suplementación con ARA+DHA durante la gestación.....	101
CONCLUSIONES / CONCLUSIONS.....	121
BIBLIOGRAFÍA.....	126

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Programación fetal de la enfermedad cardiometabólica.....	36
Figura 2. Causas de restricción del crecimiento intrauterino.....	42
Figura 3. Esquema de la síntesis de los LCPUFA.....	45
Figura 4. Modelos experimentales utilizados en el estudio.....	55
Figura 5. Determinación del sexo de los fetos.....	56
Figura 6. Protocolo experimental de corticosterona.....	59
Figura 7. Protocolo experimental de SOD.....	60
Figura 8. Protocolo experimental de medición de actividad catalasa.....	61
Figura 9. Protocolo experimental de medición de glutatión reducido.....	62
Figura 10. Protocolo experimental de medición de grupos tioles.....	63
Figura 11. Protocolo experimental de LPO.....	64
Figura 12. Protocolo experimental de medición de proteínas carboniladas.....	65
Figura 13. Protocolo experimental de PGF.....	70
Figura 14. Peso materno.....	74
Figura 15. Glucemia y proteínas plasmáticas.....	75
Figura 16. Niveles de LCPUFA en plasma materno.....	75
Figura 17. Niveles plasmáticos de corticosterona.....	76
Figura 18. Niveles plasmáticos de antioxidantes.....	77
Figura 19. Niveles plasmáticos de daño oxidativo.....	78
Figura 20. Peso de la placenta.....	79
Figura 21. Proteínas placentarias.....	79
Figura 22. Niveles de LCPUFA en la placenta.....	80
Figura 23. Daño oxidativo en placenta.....	81
Figura 24. Expresión de enzimas placentarias productoras de radicales libres.....	81
Figura 25. Expresión de enzimas placentarias eliminadoras de radicales libres.....	82
Figura 26. Factor de crecimiento placentario.....	83
Figura 27. Peso y longitud fetal.....	84
Figura 28. Pesos de órganos fetales.....	84
Figura 29. Niveles plasmáticos de corticosterona.....	85
Figura 30. Peso materno.....	86

Figura 31. Reabsorción fetal en cuernos uterinos de rata alimentada con ED.....	87
Figura 32. Glucemia y proteínas plasmáticas maternas.....	87
Figura 33. Niveles de LCPUFA en plasma materno.....	88
Figura 34. Asociación entre ARA y DHA en plasma de madres ED.....	88
Figura 35. ARA y DHA en plasma de madres ED.....	89
Figura 36. Niveles plasmáticos de corticosterona	89
Figura 37. Niveles plasmáticos de antioxidantes.....	90
Figura 38. Niveles plasmáticos de daño oxidativo.....	91
Figura 39. Peso de la placenta en función de la dieta.....	91
Figura 40. Proteínas placentaria.....	92
Figura 41. Niveles de LCPUFA en la placenta.....	93
Figura 42. ARA y DHA en placentas del grupo ED.....	93
Figura 43. Asociación entre ARA y DHA en placenta de ratas ED.....	94
Figura 44. Daño oxidativo en placenta.....	94
Figura 45. Peso y longitud fetal.....	95
Figura 46. LCPUFA en placenta y peso fetal.....	96
Figura 47. Peso de órganos fetales.....	97
Figura 48. Niveles plasmáticos de corticosterona fetal.....	97
Figura 49. Cambios maternos en ratas sometidas a restricción nutricional.....	99
Figura 50. Cambios en la placenta en el grupo MUN.....	103
Figura 51. Efectos fetales de la restricción nutricional materna.....	108
Figura 52. Cambios maternos en las ratas suplementadas.....	112
Figura 53. Alteraciones en la placenta de las ratas suplementadas.....	115
Figura 54. Cambios fetales tras la suplementación con ARA+DHA.....	118

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Recomendaciones para la ingesta de micronutrientes.....	43
Tabla 2. Contenido de ácidos grasos en las dietas y en el compuesto Formulaid™	54
Tabla 3. Determinaciones maternas, fetales y en placenta a día G20.....	56

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ALA: Ácido α -linolénico

ANOVA: Análisis de la varianza

ARA: Ácido araquidónico

C: Control

CD: Dieta control

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

DG: Diabetes gestacional

DHA: Ácido docosahexaenóico

EC-SOD: Isoforma extracelular de la superóxido dismutasa

ED: Dieta experimental

EPA: Ácido eicosapentanóico

FR: Reabsorción fetal

G11: Día 11 de gestación

G20: Día 20 de gestación

GSH: Glutation reducido

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

HNE: 4-hidroxi-2-nonenal

11 β HSD2: 11 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2

HTA: Hipertensión arterial

IUGR: Restricción del crecimiento intrauterino

LA: Ácido linolénico

LCPUFA: Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

LPO: Peroxidación lipídica

MDA: malondialdehído

Mn-SOD: Isoforma mitocondrial de la superóxido dismutasa

miRNA: micro RNA

MUN: Maternal Undernutrition

NADPH: Dinucleótido fosfato reducido de nicotinamida y adenina

NG: Crecimiento normal

NO: Óxido nítrico

O₂^{•-}: Anión superóxido

•OH: Radical hidroxilo

8-OHdG: 8-Oxo-2'-desoxiguanosina

PE: Preeclampsia

PGF: Factor de crecimiento placentario

RNS: Reactive Nitrogen Species

ROO·: Radical peroxilo

ROS: Reactive Oxygen Species

SOD: Superóxido dismutasa

VEGF: Factor de crecimiento vascular endotelial

XO: Xantina oxidasa

RESUMEN
ABSTRACT

RESUMEN

Estudios epidemiológicos y experimentales han demostrado la asociación entre la exposición a estímulos adversos durante la etapa intrauterina, un bajo peso al nacer y el desarrollo posterior de patologías cardiovasculares. Este fenómeno se conoce como “programación fetal”. Un bajo peso al nacer es un marcador de inadecuado desarrollo fetal, que puede producirse, entre otras causas, por dietas pobres o desequilibradas durante la gestación. La incidencia de bajo peso al nacer está en aumento en todo el mundo, lo que supone un problema de importancia clínica global. La placenta, como interfaz entre la madre y el feto, juega un papel crucial en la respuesta a factores estresores durante la gestación y participa en la programación fetal. La respuesta del feto a un ambiente intrauterino adverso tiene un componente sexo-dependiente, estando más protegidas las hembras de la programación fetal de las enfermedades cardiovasculares. La placenta, al tener el mismo sexo que el individuo, podría modular de forma diferente, la respuesta a factores adversos durante la gestación, en función del sexo. Esta Tesis Doctoral plantea la **hipótesis** de que alteraciones del estado nutricional durante la gestación interfieren con el crecimiento fetal a través de un estado pro-oxidativo de la placenta. Su **objetivo** es analizar, en la rata, el impacto de intervenciones nutricionales durante la gestación –desnutrición o suplementación con ácidos grasos poliinsaturados- sobre el crecimiento fetal y la implicación de la placenta en estos procesos, analizando el posible dimorfismo sexual. **Material y Métodos.** La desnutrición se indujo por una reducción del 50% de la ingesta materna durante la segunda mitad de la gestación; la suplementación se llevó a cabo con ácido araquidónico (ARA) y docosohexahenoico (DHA) a lo largo de toda la gestación. En ambos modelos se analizó la influencia de la intervención nutricional sobre la rata gestante, la placenta y el crecimiento fetal y del corazón y riñón. **Resultados desnutrición materna:** 1) redujo en la madre la cantidad de proteínas plasmáticas, manteniendo la glucemia y aumentó la corticosterona; 2) en la placenta indujo un crecimiento deficiente asociado con una reducción de proteínas y LCPUFA, aumentó los marcadores de daño oxidativo, relacionado con alteraciones sexo-dependientes en la expresión de enzimas pro y antioxidantes y 3) en el feto produjo un aumento de la

corticosterona plasmática y un menor peso corporal y del riñón, en ambos sexos, observándose un menor peso del corazón sólo en machos. **Resultados suplementación con ARA+DHA:** 1) aumentó en la madre la disponibilidad en plasma de los dos ácidos grasos, con una correlación negativa entre ambos, también aumentó algunos marcadores de daño oxidativo plasmático; 2) en la placenta produjo mayor crecimiento con acumulación de estos ácidos grasos, e incrementó los marcadores de daño oxidativo, siendo el efecto mayor en hembras, 3) en el feto produjo un menor peso corporal y, en ocasiones, reabsorción fetal, asociado con los niveles de ARA, también indujo un aumento de marcadores de daño oxidativo en la placenta, con mayor impacto en las hembras. Sin embargo, solo indujo un menor peso del corazón en machos. **Conclusiones.** La restricción nutricional en la rata produce una situación de estrés que eleva los niveles maternos de corticosterona; a través de su efecto catabólico la corticosterona puede contribuir a la baja disponibilidad de proteínas y al daño oxidativo de la placenta, con un impacto negativo sobre el crecimiento fetal. La suplementación con ARA+DHA produce una situación de daño oxidativo materno y placentario, mediada por el ARA, que puede contribuir a la restricción del crecimiento fetal, con mayor impacto en las hembras. En conjunto, estos datos indican que diferentes desequilibrios nutricionales inducen un estado pro-oxidativo de la placenta que puede participar en la restricción del crecimiento fetal. También evidencian que el corazón de machos presenta una peor respuesta a ambientes intrauterinos adversos, que es independiente de la placenta, y que puede contribuir a la mayor susceptibilidad del sexo masculino a la programación fetal de la enfermedad cardiovascular.

ABSTRACT

Epidemiological and experimental studies have demonstrated the association between exposure to adverse stimuli during the intrauterine life, low birth weight and the subsequent development of cardiovascular diseases. This phenomenon is known as "fetal programming". Low birth weight is a marker of inadequate fetal development, related, among other causes, to poor or unbalanced diets during pregnancy. The incidence of low birth weight is increasing worldwide, which is a global problem of clinical importance. The placenta, as an interface between the mother and the fetus, plays a crucial role in the response to stressors during pregnancy and participates in fetal programming. The response of the fetus to an adverse intrauterine environment has a sex-dependent component, females being protected from the fetal programming of cardiovascular diseases. The placenta, having the same sex as the individual, could modulate in a different way, the response to adverse factors during pregnancy, depending on sex. This Doctoral Thesis proposes the **hypothesis** that alterations in nutritional status during pregnancy interfere with fetal growth through a pro-oxidative state of the placenta. Its main **objective** was to analyze, in the rat, the impact of nutritional interventions during pregnancy -malnutrition or supplementation with polyunsaturated fatty acids - on fetal growth and the implication of the placenta in these processes, analyzing the possible sexual dimorphism. **Material and Methods.** Malnutrition was induced by a 50% reduction in maternal diet during the second half of pregnancy; supplementation was carried out with arachidonic acid (ARA) and docosahexaenoic acid (DHA) throughout the entire gestational period. In both models, the influence of the nutritional intervention on the pregnant rat, the placenta and on fetal development, including heart and kidney growth, was analyzed. **Results** **maternal undernutrition:** 1) in the mother it reduced the amount of plasma proteins, maintaining glycemia and increased corticosterone; 2) in the placenta it induced a deficient growth, associated with reduction of proteins and LCPUFAs and increased oxidative damage markers, which was related to sex-dependent alterations in the expression of pro and antioxidant enzymes; 3) in the fetus it produced an increase in plasma corticosterone and a lower body and kidney weight, in both sexes. However, a lower heart weight was only

observed in males. **Results supplementation with ARA + DHA:** 1) in the mother it increased the plasma availability of the two fatty acids, with a negative correlation between them, it also increased plasma oxidative damage markers; 2) in the placenta it produced increased growth with accumulation of these fatty acids; it also increased oxidative damage markers, higher in females, 3) in the fetus produced a lower body weight and, sometimes, fetal resorption, associated with ARA levels; it also increased markers of oxidative damage in the placenta, with a larger impact on females. However, it only induced a lower heart weight in males. **Conclusions** The nutritional restriction in the rat produces a situation of stress that raises maternal levels of corticosterone; through its catabolic effect, corticosterone can contribute to low protein availability and oxidative damage to the placenta, with a negative impact on fetal growth. Supplementation with ARA + DHA produces a situation of maternal and placental oxidative damage, mediated by ARA, which can contribute to fetal growth restriction, with greater impact on females. Taken together, these data indicate that different nutritional imbalances induce a pro-oxidative state of the placenta that can participate in fetal growth restriction. They also show that male heart specifically presents a worse response to an adverse intrauterine environment, independent of the placenta, which may contribute to the greater susceptibility of male sex to fetal programming of cardiovascular disease.

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

El bajo peso al nacer es un marcador de un inadecuado desarrollo fetal, por debajo del potencial del individuo. El bajo peso al nacer está relacionado con problemas maternos durante la gestación que conllevan una restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), con partos pretérmino. Estas situaciones son cada vez más prevalentes, tanto en países desarrollados como subdesarrollados. Entre otros factores, la nutrición durante la gestación juega un papel principal, conociéndose que dietas insuficientes o desequilibradas afectan de forma negativa al desarrollo fetal. Un bajo peso al nacer conlleva un mayor riesgo de mortalidad y morbilidad perinatales y, además, está asociado con el desarrollo posterior de patologías del adulto, particularmente patologías cardiometabólicas. Es por esto por lo que el conocimiento del impacto de intervenciones nutricionales en la gestación sobre el desarrollo fetal, es de gran importancia socio-sanitaria.

1. Programación fetal

Durante mucho tiempo se consideró que el feto en desarrollo se encontraba exento de sufrir daño por agentes externos, pues se suponía que estaba protegido dentro del vientre materno. Sin embargo, en las últimas décadas, se ha demostrado que los estímulos adversos o agresiones en la etapa fetal originan alteraciones permanentes en el individuo, que contribuyen al desarrollo posterior de algunas patologías en la edad adulta. Este fenómeno se conoce como “programación fetal”.

La relación entre un ambiente intrauterino adverso y la programación fetal de la enfermedad fue postulada por Barker y colaboradores, en la década de 1980, lo que se conoce como hipótesis de Barker (Barker and Osmond, 1986; Barker et al., 1993). Barker postuló esta hipótesis basándose en la relación entre un período de hambruna y alta mortalidad infantil a principios de 1900 y elevadas tasas de mortalidad por cardiopatía isquémica de los supervivientes aproximadamente 60 años después. Es decir, relacionó pobreza (malnutrición) en la etapa fetal y primeros años de vida con riesgo posterior de enfermedad cardiometabólica (Barker and Osmond, 1986). Además, Barker observó una relación inversa entre el peso al nacer y la presión arterial en la edad adulta

(Forsdahl, 1977; Barker and Osmond, 1988). El peso al nacer es un marcador importante de crecimiento fetal, por lo que estas observaciones fortalecieron aún más la hipótesis de que influencias adversas que afectan negativamente al desarrollo fetal y que producen crecimiento deficiente, aumentan el riesgo de enfermedad cardiovascular en etapas posteriores de la vida (Barker and Osmond, 1988).

Estudios epidemiológicos posteriores han dado peso a la hipótesis de Barker. Una de las poblaciones más estudiada en relación con la programación fetal ha sido la descendencia de mujeres que vivieron etapas de hambruna durante la segunda guerra mundial, particularmente la cohorte holandesa expuesta a la hambruna de 1944–1945. Estos estudios han corroborado la relación entre insuficiente aporte de alimentos y desarrollo de patologías del adulto. Además de patología cardiovascular, se ha evidenciado que un ambiente intrauterino adverso se relaciona con patologías metabólicas como la Diabetes Mellitus y la obesidad. Estos estudios también han puesto de manifiesto que la desnutrición fetal tenía diferentes efectos dependiendo de su periodo de exposición. Así, las mujeres expuestas a la desnutrición durante etapas tardías de la gestación, tuvieron bebés con bajo peso al nacer, mientras que aquellas expuestas solo durante etapas tempranas, tuvieron bebés con un peso normal al nacer. Por otro lado, se observó que los bebés que fueron concebidos justo antes de la hambruna, en la vida adulta tuvieron mayor riesgo de resistencia a la insulina y una tolerancia a la glucosa alterada, y aquellos concebidos durante la hambruna presentaron mayor riesgo de hipercolesterolemia, hipertensión arterial (HTA) y enfermedad coronaria (Ravelli et al., 1999; Roseboom et al., 2001; Painter et al., 2005).

Otros estudios llevados a cabo en diversas regiones geográficas, en poblaciones que han sufrido desnutrición debido a guerras o a periodos de hambrunas, como India (Stein et al., 1996), Biafra (Hult et al., 2010) o China (Wu L et al., 2017), han corroborado la asociación entre deficiencia en el crecimiento fetal y posterior desarrollo de hipertensión, enfermedad coronaria, diabetes y obesidad. Hoy en día está bien establecido que condiciones adversas durante la gestación que, en general, derivan en un bajo peso al nacer, “programan al feto” y aumentan el riesgo de desarrollar una enfermedad

cardiometabólica en la edad adulta (Nuyt, 2008; Poston, 2011; Morton et al., 2016).

1.1 Factores adversos que participan en la programación fetal

Existen diversos factores que suponen una situación de estrés para el feto, los cuales pueden influir de manera negativa en su desarrollo y contribuir a la programación fetal. A continuación, se exponen los más importantes.

Malnutrición

El término “malnutrición” materna no sólo implica una carencia de nutrientes (desnutrición) durante la gestación, sino también una inadecuada alimentación debida a un exceso de calorías (sobrenutrición) o a un desequilibrio en la proporción de nutrientes como, por ejemplo, dietas con exceso de grasa. Ambas situaciones de malnutrición durante la gestación se han asociado con la programación fetal.

La desnutrición materna puede resultar de una dieta que no aporta una adecuada ingesta calórica o puede ser causada por una dieta con cantidades reducidas de alguno de los macronutrientes. También se ha demostrado que las dietas deficientes en micronutrientes contribuyen al bajo peso y a la prematuridad (Domellöf, 2013). Por otro lado, la obesidad materna, o una excesiva ganancia de peso durante la gestación por dietas desequilibradas, así como el desarrollo de diabetes gestacional, generan neonatos macrosómicos. Se ha evidenciado, que un exceso de peso al nacer, al igual que un bajo peso, también se asocia con mayor predisposición a la enfermedad cardiometabólica. Así, Boney et al. (2005) demostró que los hijos de madres con obesidad o diabetes gestacional tenían un mayor riesgo de desarrollar síndrome metabólico, HTA y diabetes mellitus tipo 2 (Boney et al., 2005).

Disfunción placentaria

Otro factor que puede influir negativamente en el desarrollo fetal y causar un bajo peso al nacer es una disfunción placentaria ya que la placenta es un órgano fundamental para el crecimiento y desarrollo fetal óptimos. La disfunción placentaria ocurre cuando la placenta no se desarrolla adecuadamente o cuando su flujo sanguíneo no es suficiente. Estas

alteraciones de la placenta pueden reducir la superficie de intercambio o el número de transportadores. Otra consecuencia es la reducción del aporte de oxígeno al feto. Diversas patologías gestacionales como la hipertensión gestacional o la preeclampsia (PE) alteran la función de la placenta y se asocian con inadecuado aporte de nutrientes al feto (Brett et al., 2014). También se asocian con IUGR, bajo peso al nacer y riesgo de enfermedades cardiometabólicas en la edad adulta (Longtine and Nelson, 2011).

Exposición a tóxicos

La exposición fetal a tóxicos, incluidas sustancias como el tabaco y el alcohol, relacionadas con hábitos y estilos de vida, así como contaminantes ambientales, comprometen el desarrollo fetal y, a su vez, pueden programar al feto para el desarrollo posterior de enfermedad cardiometabólica.

Fumar durante el embarazo, además de producir alteraciones congénitas cardíacas (Forest and Priest, 2016), también disminuye el peso al nacer y se ha relacionado con el desarrollo de HTA en la edad adulta (Bergen, 2006). Los efectos deletéreos del tabaco sobre el desarrollo fetal pueden estar relacionados con fenómenos de hipoxia (Banderali et al., 2015) y de estrés oxidativo (Al-Gubory, 2016).

El consumo del alcohol en la gestación se ha asociado ampliamente con efectos adversos en el feto, incluidos defectos múltiples, particularmente trastornos del neurodesarrollo (Bosco and Diaz, 2014). Incluso en bajas concentraciones, el alcohol se relaciona con bajo peso al nacer y, por consiguiente, con la programación fetal. La hipótesis más plausible según la cual el alcohol provoca estos efectos es a través de necrosis en el tejido placentario ocasionando procesos isquémicos que interfieren con la señalización celular, modificando la síntesis de proteínas y el transporte placentario (Bosco and Diaz, 2012).

Por otro lado, es bien conocido que algunos contaminantes ambientales, como Bisfenol A, metales pesados, etc., son teratógenos en concentraciones elevadas. La exposición a pequeñas dosis durante la gestación también puede interferir con el crecimiento fetal. Incluso, aunque un solo compuesto no induzca un efecto adverso, la exposición a múltiples contaminantes tiene

resultados adversos acumulativos, incluso en concentraciones bajas (Al-Gubory, 2016).

Glucocorticoides

La exposición intrauterina a altos niveles de glucocorticoides puede tener efectos adversos sobre el crecimiento fetal. Existen evidencias de que la exposición fetal a glucocorticoides sintéticos se asocia con bajo peso al nacer (Murphy et al., 2012), con alteraciones en la cognición infantil (Newnham et al., 2002) y con el desarrollo de HTA en la vida adulta (Harris and Seckl, 2011). En condiciones normales, las concentraciones de glucocorticoides son bajas en el feto gracias a la enzima placentaria 11β hidroxisteroide deshidrogenasa tipo 2 (11β HSD2), expresada por el trofoblasto y que convierte el cortisol en cortisona inactiva, protegiendo al feto contra una posible elevación de los niveles de cortisol materno. Sin embargo, esta barrera enzimática puede estar inhibida en situaciones de desnutrición, exposición a tóxicos y disfunción placentaria (Ramiro-Cortijo et al., 2017). Además, en humanos, se ha descrito que mutaciones en el gen 11β HSD2 se asocia con bajo peso al nacer (Seckl et al., 2000). La exposición a glucocorticoides sintéticos en mujeres embarazadas es habitual en la práctica clínica, ya que se utilizan en mujeres con riesgo de parto prematuro. Sin embargo, en esta situación son necesarios, ya que la prematuridad se asocia con numerosas complicaciones del neonato tanto en la etapa perinatal, como a largo plazo.

1.2 Modelos experimentales para el estudio de la programación fetal

Para el estudio de la programación de enfermedades cardiometabólicas se han desarrollado diversos modelos experimentales, utilizando distintas especies animales, en los que es posible llevar a cabo un estudio longitudinal, así como intervenciones que permitan demostrar los mecanismos implicados en la programación. En estos modelos se realizan intervenciones durante la gestación que mimeticen los distintos factores adversos que se han mencionado anteriormente y se estudia la evolución de la descendencia. A continuación, se describen los modelos más frecuentes.

Modelos nutricionales

La restricción calórica global durante la gestación es una de las intervenciones más utilizadas para el estudio de programación fetal (Ergaz et al., 2005; Morton et al., 2016; Rodríguez-Rodríguez et al., 2017). Existen varios tipos de intervención, llevados a cabo en distintas especies, que van desde de la restricción calórica global severa (70% de la ingesta ad libitum), moderada (50%) o leve (30%), siendo la más común la moderada. La restricción nutricional puede realizarse durante toda la gestación o en etapas específicas (primera o segunda mitad). La restricción calórica global produce individuos de bajo peso al nacer y programa el desarrollo de HTA, y obesidad entre otras alteraciones (Ergaz et al., 2005; Muñoz-Valverde et al., 2015; Rodríguez-Rodríguez et al., 2017).

Otros modelos restringen específicamente la ingesta de proteínas, manteniendo una dieta isocalórica. En roedores se utiliza habitualmente un 8% de proteína frente a un 20%, que es la cantidad normal en el pienso. Esta dieta también induce IUGR y programa para HTA (Nishina et al., 2003).

En cuanto a los modelos en los que se administra un exceso de nutrientes, uno de los más frecuentemente utilizados son las dietas altas en grasas. Se ha demostrado que esta intervención predispone al desarrollo de resistencia a la insulina (Buckley et al., 2005) y de HTA (Khan et al., 2005). Otros modelos administran durante la gestación una dieta elevada en fructosa, habiéndose demostrado que esta intervención, también predispone al desarrollo de HTA en la edad adulta (Tain et al., 2016).

Modelos de disfunción placentaria

Se han utilizado diversas intervenciones quirúrgicas para generar un modelo que mimetice una insuficiencia placentaria, lo que genera una reducción de nutrientes y de oxígeno al feto. En estudios experimentales, se ha demostrado que una insuficiencia en el aporte de nutrientes al feto a través de la placenta se asocia con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y metabólicas en la edad adulta (Godfrey 2002). El modelo más frecuentemente utilizado es la ligadura uterina bilateral. Este modelo en rata consiste en realizar la ligadura de las arterias uterinas en la última semana de gestación; es decir, entre los

días 16 a 19. En este modelo los fetos nacen con bajo peso (aproximadamente 20% menor) (Janot et al., 2014) y presentan IUGR e hiperisulinemia (Nüsken et al., 2008). La insuficiencia placentaria no solo produce inadecuado aporte de nutrientes sino también de oxígeno. Una situación de hipoxia *per se* también predispone para la enfermedad cardiometabólica. Así, en diversos modelos animales en lo que se restringe el oxígeno durante la gestación se ha demostrado que induce bajo peso al nacer y alteraciones en diversos órganos (Thompson and Al-Hasan, 2012). A su vez se han asociado con la programación fetal de enfermedades cardiometabólicas (Nestlerenko and Aly, 2009).

Modelos de exposición a tóxicos

Se han utilizado numerosos modelos en los que se expone al animal durante la gestación a diversos tóxicos, tanto medioambientales como alcohol o nicotina. Algunos modelos de exposición a nicotina durante la gestación se han asociado a un bajo peso al nacer (Mohsenzadeh et al., 2014), mientras que la exposición intrauterina al alcohol se ha relacionado con menor número de nefronas y desarrollo de HTA (Gray et al., 2010).

Modelos de exposición a glucocorticoides

Se han desarrollado diversos modelos animales en los que se administran glucocorticoides a la rata gestante. Por ejemplo, la administración de dexametasona durante la gestación se ha asociado con menor número de nefronas y desarrollo de HTA en la edad adulta (Ortiz et al., 2001). Otros modelos han asociado la exposición a betametasona durante la gestación con IUGR (Ni et al., 2018).

1.3 Dimorfismo sexual en la programación fetal

Estudios en los modelos de programación fetal mencionados anteriormente han constatado que el desarrollo de alteraciones cardiometabólicas producidas por exposición a un factor estresor durante la etapa intrauterina presenta un dimorfismo sexual, estando más afectados los machos (Morton et al., 2016). Esto se ha observado particularmente en la HTA que, mayoritariamente sólo se desarrolla en los machos. Aunque algunos estudios evidencian que también aparece en hembras pero en etapas más tardías o de forma moderada (Ozaki

et al., 2001; Ortiz et al., 2003; Grigore et al., 2008; Rodríguez-Rodríguez et al., 2017). Se ha sugerido que este dimorfismo sexual en el desarrollo de hipertensión está relacionado con las hormonas sexuales; por un lado con la función protectora de los estrógenos y, además, se ha sugerido que alteraciones de la testosterona también pueden tener un papel (Alexander et al., 2015). Sin embargo, algunos datos apuntan a que este dimorfismo sexual ya está presente en animales prepúberes (Rodríguez-Rodríguez et al., 2017), lo que sugiere que puede haber otros mecanismos implicados. En este sentido, se ha sugerido que la placenta podría jugar un papel en el dimorfismo sexual de la programación fetal de la enfermedad cardiometabólica (Kalisch-Smith et al., 2017).

Aunque este dimorfismo sexual está bien establecido en animales de experimentación, no es tan claro en humanos, ya que la asociación entre un bajo peso al nacer y la hipertensión se encontró tanto en hombres como en mujeres (Osmond and Barker, 2000; Rich-Eddwards et al., 2005). Sin embargo, existe evidencia de que esta asociación y otras alteraciones relacionadas, como la disfunción renal, se producen de forma más importante en varones (Li et al., 2008). Las discrepancias entre los diversos estudios pueden estar relacionadas con la edad de la población de estudio y la presencia o no de menopausia (Alexander et al., 2015).

1.4 Mecanismos implicados en la programación fetal

A continuación, se describen algunos de los mecanismos propuestos para explicar la asociación entre un ambiente intrauterino adverso y el desarrollo de enfermedad cardiometabólica.

1.4.1 Alteraciones orgánicas

Se ha demostrado que independientemente del factor estresor durante la etapa intrauterina, se produce una serie de alteraciones comunes; entre las cuales está un número reducido de células en algunos órganos.

Alteraciones renales. Se ha sugerido que un estrés fetal conduce a un inadecuado desarrollo renal y a una reducción en el número de nefronas. Esto tiene como consecuencia una hipertrofia e hiperfiltración glomerular, retención

renal de sodio y aumento de la presión capilar glomerular. A largo plazo, estas alteraciones conducen a una reducción irreversible de la función renal y un aumento de la presión arterial en la edad adulta (Hershkovitz et al., 2007). Así, en humanos se ha constatado que el bajo peso al nacer se asocia con menor número y volumen glomerular (Manalich et al., 2000). Por otro lado, en varios modelos animales de programación fetal también se ha demostrado que el estrés durante la etapa intrauterina produce disminución del tamaño renal, asociado a HTA en la edad adulta (Vehaskari et al., 2001; Paixao and Alexander, 2013).

Alteraciones cardíacas. De forma similar a lo que ocurre en el riñón, la falta de nutrientes durante la vida intrauterina produce reducción del número de cardiomiocitos en el feto (Corstius et al., 2005; Stacy et al., 2009; Zohdi et al., 2014). También se ha demostrado que la desnutrición fetal, se asocia con remodelado cardíaco e HTA en la edad adulta (Xu et al., 2006), así como alteraciones funcionales del corazón (Hu et al., 2000; Xu et al., 2006; Elmes et al., 2007). Las alteraciones estructurales del corazón observadas en estos modelos podrían estar asociadas con la propia HTA al ser ésta un factor de riesgo de hipertrofia cardíaca. Sin embargo, algunos autores evidencian una hipertrofia cardíaca en animales sometidos a desnutrición fetal en edades tempranas –previas a la aparición de HTA- lo que sugiere mecanismos independientes de la elevación de la presión arterial (Gezmish et al., 2010; Tarry-Adkins et al., 2013; Rodríguez-Rodríguez et al., 2017).

Alteraciones vasculares. Un bajo peso al nacer también se asocia con diversas alteraciones vasculares, incluyendo disfunción endotelial y remodelado vascular. En seres humanos, sometidos a condiciones adversas en la etapa intrauterina se han evidenciado signos de disfunción endotelial incluso a edades tempranas (Leeson et al., 2001). Por otro lado, estudios en diversos modelos animales de restricción nutricional durante la gestación y en modelos de alteraciones del flujo uterino se ha demostrado aumento de la respuesta a vasoconstrictores, en algunos y reducción de las respuestas endotelio-dependientes en otros (Nuyt, 2008; Poston, 2011). Por otro lado, alteraciones en la estructura de los vasos o remodelado vascular también se han asociado con la programación fetal. También ratas sometidas a desnutrición fetal

presentan hipertrofia de la aorta al nacimiento (). Es bien conocida la importancia de la elastina en la complianza arterial y, se ha sugerido que una deficiente síntesis durante la etapa fetal puede jugar un papel en la programación de la HTA (Martyn and Greenwald, 1997). Estudios posteriores en animales de experimentación han confirmado esta hipótesis al haber demostrado remodelado y rigidez vascular en asociación con exposición a factores estresores en la etapa fetal (Armitage et al., 2005; Gutiérrez-Arzapalo et al., 2017).

Alteraciones en el tejido adiposo. Una escasez de nutrientes durante la etapa fetal puede conducir a cambios metabólicos que, a corto plazo permiten la supervivencia, pero que, en ambiente postnatal con suficiente acceso de nutrientes contribuye al acúmulo de grasa en exceso. Así, en humanos, el bajo peso al nacer secundario a desnutrición materna durante la primera mitad de la gestación se asoció con un aumento en el tejido adiposo en etapas posteriores, sobre todo grasa abdominal y troncal y mayores tasas de obesidad en la edad adulta (Ravelli et al., 1999). En algunos estudios de restricción global nutricional en roedores también se ha demostrado que el bajo peso al nacer se relaciona con adipocitos hipertróficos, crecimiento postnatal acelerado, hiperfagia y desarrollo de obesidad en la edad adulta (Desai et al., 2008; Muñoz-Valverde et al., 2015).

1.4.2 Cambios epigenéticos

Los mecanismos epigenéticos influyen esencialmente en la expresión a largo plazo de un gen al alterar la capacidad de la maquinaria transcripcional. Los mecanismos de acción epigenética incluyen la metilación del DNA, modificaciones de histonas postraduccionales y la represión y activación mediada por microARNs (Vo and Hardy, 2012). La modulación epigenética es reversible, a diferencia de la información genética que es altamente estable, y está influenciada por diversos factores, entre los que pueden incluirse los hábitos alimentarios y otros factores relacionados con estilos de vida como la exposición a tóxicos. Además un entorno materno desfavorable durante el embarazo puede tener una importante influencia en la modulación de la expresión génica en el feto a través de mecanismos epigenéticos. Así, diversos

estudios sugieren que los cambios epigenéticos son uno de los mecanismos responsables de la programación fetal (Gluckman et al., 2009). Se ha encontrado que una insuficiencia útero-placentaria produce alteraciones de la metilación de algunos genes asociado a una reducción en el número de nefronas (Gicquel et al., 2008). Otros estudios demuestran que la disfunción endotelial y otras alteraciones asociadas a la HTA se relacionan con una reducción en la metilación de algunos genes como los que codifican para el receptor AT1 de angiotensina (Bogdarina et al., 2007), el PPAR- α o el receptor de glucocorticoides (Burdge et al., 2007b). Estudios en supervivientes de la hambruna de Holanda, mostraron que la restricción calórica durante el periodo perinatal tuvo un efecto sobre la metilación del gen del IGF-2 (Heijmans et al., 2008). Por lo tanto, la evidencia experimental apunta a que los mecanismos epigenéticos están relacionados con la expresión y mantenimiento a largo plazo de los efectos de la programación fetal (Burge et al., 2007a).

1.4.3 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es uno de los nexos de unión más plausibles entre un crecimiento fetal adverso y un aumento de riesgo de desarrollar enfermedades cardiometabólicas en la edad adulta (Luo et al., 2006; Thompson and Al-Hasan 2012; Rodríguez-Rodríguez et al., 2018).

Como consecuencia del metabolismo aerobio se generan especies químicas altamente reactivas, conocidas como especies reactivas de oxígeno (ROS), que son moléculas que contienen al menos un átomo de oxígeno y que tienen el potencial de generar radicales libres. Otros radicales libres de importancia biológica son los derivados de las especies reactivas de nitrógeno (RNS); si bien, los ROS representan la clase más abundante en los sistemas biológicos (Miller et al., 1990). Las especies reactivas son moléculas que, a bajas concentraciones, participan en el organismo en importantes funciones fisiológicas como la señalización celular y la defensa inmunitaria (Valko et al., 2007). Sin embargo, como estas sustancias son prooxidantes, cuando se encuentran en exceso pueden producir daño oxidativo a macromoléculas (lípidos, proteínas y DNA), lo que altera la función celular, contribuyendo al desarrollo de patologías como el cáncer, las enfermedades neurodegenerativas

y las enfermedades cardiometabólicas (Marchesi et al., 2009; El Assar et al., 2013).

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

Prooxidantes

Anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$). Se forma mediante la adición de un electrón al oxígeno molecular. Este proceso está mediado por la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa, la xantina oxidasa (XO) o por el sistema de transporte de electrones mitocondrial (Hayyan et al., 2016). El sitio principal de producción de anión superóxido es la mitocondria.

Radical hidroxilo ($\cdot OH$). Es el ROS más reactivo y puede dañar proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA. También puede iniciar la peroxidación de lípidos tomando un electrón de ácidos grasos poliinsaturados. El radical hidroxilo puede ser generado por varias vías, en las cuales está implicado el $O_2^{\cdot-}$.

Peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 no es un radical libre pero sí es uno de los principales ROS. El H_2O_2 es producido por un grupo de enzimas denominadas superóxido dismutasas (SODs), que descomponen el $O_2^{\cdot-}$ a O_2 y H_2O . También es producido por xantina oxidasa, aminoácido oxidasa y NADPH oxidasa (Kelley et al., 2009).

Óxido nítrico (NO). Es un radical libre desde el punto de vista físico por poseer un electrón desapareado, aunque no se conoce que induzca reacciones capaces de oxidar macromoléculas. Sin embargo, el NO puede reaccionar fácilmente con el anión superóxido para formar peroxinitritos, que son moléculas altamente reactivas y deletéreas por su gran capacidad oxidativa. El NO se sintetiza a partir de la L-arginina por la enzima sintasa de NO y participa como molécula de señalización en muchos procesos biológicos y en particular en la regulación de la presión arterial (Hermann et al., 2006).

Antioxidantes

El concepto de antioxidante biológico se refiere a cualquier compuesto que, en bajas concentraciones es capaz de prevenir o retrasar la oxidación de moléculas (Pisoschi and Pop, 2015). Los sistemas antioxidantes más importantes se describen a continuación.

Superóxido dismutasa (SOD). Constituye la primera defensa enzimática que presenta la célula para hacer frente a la producción del radical $O_2^{\cdot-}$. Se han caracterizado tres isoenzimas en mamíferos, que difieren tanto en su localización celular como en los cofactores metálicos de sus centros activos: Cu/Zn-SOD (SOD1, está principalmente en el citosol); Mn-SOD (SOD2, está en la matriz mitocondrial) y EcSOD (SOD3, se localiza en la matriz extracelular) (Zelko et al., 2002).

Catalasa. Es una enzima que está presente principalmente en los peroxisomas de las células de mamíferos. Tiene dos actividades enzimáticas que dependen de la concentración de H_2O_2 ; si es alta, la catalasa actúa catalíticamente, es decir, elimina el H_2O_2 formando H_2O y O_2 , mientras que a una concentración baja y en presencia de un donante de hidrógeno adecuado (etanol, metanol, etc.) la catalasa actúa eliminando H_2O_2 y a la vez peroxidando su sustrato (Scibior and Czczot, 2006).

Vitaminas C y E. La vitamina C proporciona una capacidad antioxidante intracelular y extracelular principalmente mediante la eliminación de radicales libres de oxígeno. Por otro lado, la vitamina E, al ser liposoluble, se concentra en el interior hidrofóbico de la membrana celular y es la principal defensa contra la lesión de fosfolípidos de la membrana inducida por oxidantes.

Glutación (GSH). Es el principal antioxidante intracelular de bajo peso molecular y se encuentra en grandes cantidades en el plasma sanguíneo (Ballatori et al., 2009). Tiene un papel en la conversión de vitamina C y E a sus formas activas, protege a las células contra la apoptosis al interactuar con las vías de señalización (Marsella et al., 2005) y también regula y activa varios factores de transcripción.

Polifenoles. Son los principales antioxidantes adquiridos a través de la dieta (Lotito and Frei, 2006). Se ha demostrado que los polifenoles tienen una

importante capacidad antioxidante *in vitro*. Sin embargo, su actividad *in vivo* es más cuestionable y puede estar limitada por factores como la capacidad de absorción, la biodisponibilidad o la tasa de depuración (Manach et al., 2005).

Biomarcadores de daño oxidativo

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

Biomarcadores de oxidación a lípidos. Los lípidos, al encontrarse en las membranas celulares, son las macromoléculas más accesibles a la acción de prooxidantes y, por tanto, son las que se oxidan en primer lugar, alterando la forma y función celular. El malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), junto con los isoprostanos, son los productos de peroxidación lipídica más usualmente detectados (Dreissigacker et al., 2010).

Biomarcadores de oxidación a proteínas. Las proteínas son macromoléculas que también son susceptibles de oxidación. La determinación de la oxidación de proteínas es relevante ya que contribuye a alterar la función de enzimas, receptores y también modifica la función celular. Entre los biomarcadores más utilizados destaca la medida de los niveles de proteínas carboniladas (Berlett and Stadman, 1997). Este biomarcador tiene algunas ventajas en comparación con la medición de otros productos de oxidación debido a su formación relativamente temprana y a su estabilidad.

Biomarcadores de oxidación a DNA. Aunque el DNA está más protegido que los lípidos y las proteínas, y por lo tanto es menos susceptible a la oxidación, los ROS/RNS también conducen a varios tipos de modificaciones en el DNA, incluida la oxidación de nucleótidos, la rotura de cadenas y la pérdida de bases (Dizdaroglu et al., 2002). El biomarcador más frecuentemente utilizado como medida del daño a DNA es el 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG).

En la Figura 1 se resumen los sucesos que ocurren durante la programación fetal de la enfermedad cardiometabólica.

Figura 1. Programación fetal de la enfermedad cardiometabólica



Esquema donde se resume los sucesos que ocurren en la programación fetal de la enfermedad cardiometabólica. HTA, hipertensión arterial.

2. La gestación

La gestación es el período que transcurre entre la implantación del cigoto en el útero, hasta el momento del parto y hace referencia a los procesos fisiológicos de crecimiento y desarrollo del feto en el interior del útero materno. Durante este periodo se producen en la mujer cambios fisiológicos, metabólicos e incluso morfológicos encaminados a proteger, nutrir y permitir el desarrollo del feto.

Una gestación normal dura en promedio 40 semanas (rango 37-42). El embarazo se suele dividir en tres etapas de tres meses cada una, con el objetivo de simplificar la referencia a los diferentes estados de desarrollo del feto: primero, segundo y tercer trimestre. Este último marca el principio de la viabilidad que quiere decir que el feto podría llegar a sobrevivir de ocurrir el parto ya sea natural o inducido, ya que a partir de este momento los pulmones fetales se encuentran formados casi totalmente, solo les falta madurar. Si el parto se produce previo a la semana 37 de gestación se considera un parto prematuro o pretérmino.

2.1 La placenta

La placenta humana es un órgano discoidal que comienza a formarse en la segunda semana del embarazo y su formación culmina en el cuarto mes de la gestación, aunque, durante el resto del embarazo, la placenta suele sufrir cambios. La placenta a término tiene un diámetro aproximado de 22 cm, un grosor de 2.5 cm y un peso aproximado es de 500 gramos (Huppertz and Kingdom, 2012). De forma similar que en el ser humano, la rata presenta una placenta de tipo hemocorial, que se caracteriza por un alto grado de invasión del trofoblasto de los vasos uterinos maternos. En la rata, se pueden distinguir dos estructuras placentarias: la placenta coriovitelina y la placenta corioalantóica. La primera se observa entre los días 7-12 de gestación y es importante en el periodo entre la implantación y la mitad de la gestación. La placenta corioalantóica, representa la placenta definitiva y su desarrollo comienza en el día 12 y sigue hasta el final de la gestación (Fonseca et al., 2012).

La placenta, siendo la interfaz principal entre la madre y el feto, es importante para nutrir al feto a lo largo de la progresión normal del embarazo (Myllynen and Vähäkangas, 2013). La placenta realiza diversas funciones, como proporcionar una barrera inmunológica entre el feto y la madre, el transporte de nutrientes, eliminación de desechos fetales y producción de hormonas, citoquinas y moléculas de señalización (Duttaroy, 2004). Además, el transporte de nutrientes de la placenta depende de su desarrollo vascular, que determina el flujo de sangre a ambos lados de la placenta; por lo tanto, la angiogénesis y la vasculogénesis tanto en la circulación uteroplacentaria como feto-placentaria son de vital importancia.

En virtud de estas funciones, la placenta es un elemento clave, que desempeña un papel directo en la programación fetal ya que, puede cambiar el patrón de señalización hormonal y/o modificar la cantidad de sustratos transportados al feto, alterando el desarrollo fetal. Existe abundante evidencia de alteraciones en estos parámetros en embarazos complicados con IUGR, PE y diabetes gestacional. Por otro lado, se ha descrito que existen alteraciones en la expresión de transportadores de glucosa y aminoácidos en la placenta en presencia de diversas complicaciones gestacionales maternas, entre ellas el

IUGR (Myatt, 2006). En tercer lugar, la exposición fetal a glucocorticoides también modifica la función placentaria. Todos estos datos sugieren que un inadecuado desarrollo placentario puede ser el origen de un deficiente desarrollo fetal y por lo tanto de programación fetal.

Un aspecto importante es el hecho de que la placenta sintetiza el feto a partir del trofoblasto, por lo tanto tiene el mismo sexo del feto. Este hecho conduce a la hipótesis de que la placenta masculina y femenina puede presentar diferente sensibilidad a factores estresores durante la gestación y por lo tanto, puede contribuir al dimorfismo sexual de la programación fetal de la enfermedad cardiometabólica (Gabory et al., 2013).

2.2 Patrones de gestación en la actualidad y peso al nacer

El estado biológico y emocional de la mujer durante la gestación es fundamental para el resultado obstétrico. Ambos aspectos están influenciados en gran medida por factores socioeconómicos y por lo tanto es diferente en los países con bajo nivel de ingresos o en países desarrollados.

En los países subdesarrollados el principal problema es la falta de higiene y e insuficiente acceso a alimentos durante la gestación, lo que se relaciona con bajo peso al nacer y alta mortalidad materno-infantil. Otro problema, que comparten países de muy bajos recursos con países en vías de desarrollo son los embarazos en adolescentes, ya que es más probable que éstos ocurran en comunidades marginadas, comúnmente impulsadas por la pobreza, la falta de educación y oportunidades de empleo. Cada año, aproximadamente 16 millones de adolescentes entre 15 a 19 años y 2,5 millones de niñas menores de 16 años tienen su primer embarazo (UNFPA, 2015). Este problema ocurre con mayor frecuencia en el continente africano y en América del sur. Las gestaciones en adolescentes también se relacionan con un bajo peso al nacer, ya que la adolescencia es un periodo de crecimiento, por lo que madre y feto compiten por nutrientes (Ramiro-Cortijo et al., 2017). Los embarazos adolescentes también tienen un mayor riesgo de patologías de la gestación y de morbimortalidad materna e infantil. Asimismo, los nacidos de madres menores de 20 años enfrentan mayores riesgos de parto prematuro también asociado con bajo peso al nacer (Ganchimeg, 2014).

Los países desarrollados enfrentan otro tipo de problemas en la gestación. En la actualidad una de las características más destacables es el retraso en la maternidad. La progresión demográfica en Europa en el siglo XX y XXI tiene una clara tendencia hacia una disminución de la natalidad y un aumento de la edad materna. En España, según datos del Instituto Nacional de Estadística, entre los años 2009-2016 la edad media de primera gestación maternidad ha ido aumentando progresivamente; en el 2009 fue de 30.4 años y de 31.3 años en el 2016. Los datos de la población española son similares a los de otros países del mismo entorno socioeconómico de la Unión Europea (Bréart et al., 2003), así como de Estados Unidos (Ventura et al., 2009) y Australia (STATISTICS, 2007).

Este retraso en la edad de maternidad tiene importantes consecuencias biológicas, que también derivan en un alto número de gestaciones con bajo peso al nacer. Por un lado, un problema de infertilidad y de esterilidad que conlleva un mayor uso de técnicas de reproducción asistida; este tipo de gestaciones se asocian con embarazos múltiples de bajo peso. Además, la gestación en edades avanzadas conlleva riesgo de complicaciones, tanto obstétricas como fetales, asociadas a bajo peso al nacer o también a macrosomía que se detallan a continuación. Todos estos datos sugieren el riesgo de enfermedad cardiometabólica en las futuras generaciones pueden seguir en progresión ascendente en todo el mundo.

2.3 Complicaciones obstétricas

Las complicaciones maternas durante la gestación, no sólo comprometen la salud de la madre, sino que también se asocian a un peor crecimiento fetal lo que, como se ha indicado en apartados anteriores, predisponen al desarrollo de enfermedades cardiometabólicas en la edad adulta. Entre las complicaciones obstétricas más importantes destacan la PE y la diabetes gestacional.

2.3.1 Preeclampsia

La preeclampsia (PE) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad materna en todo el mundo. Es un síndrome multiorgánico específico del embarazo que afecta al 2–8% de los embarazos, pudiendo llegar al 13% en algunos países. Se caracteriza por ser de nuevo inicio y relacionado con el

embarazo, por la presencia de HTA y proteinuria, identificada después de las 20 semanas de gestación. La PE causa daños multisistémicos debido a alteraciones vasculares en diversos órganos que conducen a insuficiencia cardíaca y renal, daño hepático, hemorragia cerebrovascular, edema pulmonar, coagulopatía intravascular diseminada, isquemia placentaria, entre otras. En el feto provoca prematuridad, IUGR y también muerte fetal intrauterina. La PE también predispone a la madre al desarrollo posterior de enfermedades cardiometabólicas (Irgens et al., 2001). Tranquilli et al., describió que haber tenido PE era un factor de riesgo no solo para la salud futura de la madre, sino que también afectaba la salud de la descendencia en la edad adulta. Los niños nacidos de embarazos preeclámpticos eran más propensos a la HTA, resistencia a la insulina y diabetes mellitus, problemas neurológicos, accidentes cerebrovasculares y trastornos mentales en etapas posteriores de la vida (Tranquilli et al., 2012).

2.3.2 Diabetes gestacional

La diabetes gestacional (DG) se define por la intolerancia a la glucosa de inicio reciente durante el embarazo. Alrededor del 2-5% de las mujeres embarazadas desarrollan DG durante el embarazo y su prevalencia ha aumentado considerablemente durante la última década. La patogenia de la enfermedad sigue siendo, en gran parte, desconocida (Monteiro et al., 2016), aunque se sabe que esta condición metabólica se manifiesta cuando las células β pancreáticas pierden su capacidad para compensar el aumento de la resistencia a la insulina, que se produce de forma fisiológica durante el embarazo. Aunque la DG por lo general resuelve dentro de las 6 semanas posteriores al parto, aproximadamente el 50% de las mujeres diagnosticadas desarrollará Diabetes Mellitus posteriormente (Lee et al., 2007). Además, las mujeres con DG presentan mayor riesgo de desarrollar otras complicaciones del embarazo, como la PE y, su descendencia tiene un mayor riesgo de resultados adversos a corto plazo, como macrosomía, hipoglucemia y disfunción cardíaca. Al igual que el bajo peso al nacer, la macrosomía se relaciona también con complicaciones a largo plazo, como obesidad, alteración de la tolerancia a la glucosa y diabetes que se manifiestan en la adolescencia o en la edad adulta (Jovanovic and Pettitt, 2001; Phillips and Jeffries, 2006).

2.4 Complicaciones fetales y peso al nacer

2.4.1 Prematuridad

Como se indicó anteriormente, se considera un parto prematuro aquel inferior a las 37 semanas de gestación. En Europa, la tasa de nacimientos prematuros es del 5-9%, mientras que en los Estados Unidos llega al 13%. La prematuridad tiene un origen multifactorial; entre los factores que predisponen a su desarrollo se encuentran el consumo de tabaco o de alcohol, un bajo nivel socioeconómico, una edad mayor de 35 o menor de 18 años al inicio de la gestación, un déficit nutricional y tener antecedentes de parto prematuro. También son factores que predisponen a un parto prematuro las gestaciones múltiples (el 54% de las gestaciones gemelares son prematuros), factores psicológicos (ansiedad y depresión durante el embarazo), complicaciones maternas (hipertensión gestacional o DG) o complicaciones placentarias (placenta previa o sangrados vaginales). Por otro lado, los neonatos prematuros presentan una mayor prevalencia de complicaciones neonatales como ictericia, hipoglicemia, displasia broncopulmonar, hemorragia intracraneal, retinopatía o enterocolitis necrotizante (Basso and Wilcox, 2010). Además, existe evidencia de que los bebés prematuros, que presentan bajo peso al nacer, también tienen un mayor riesgo de enfermedad cardiometabólica en la edad adulta (Bayman et al., 2014).

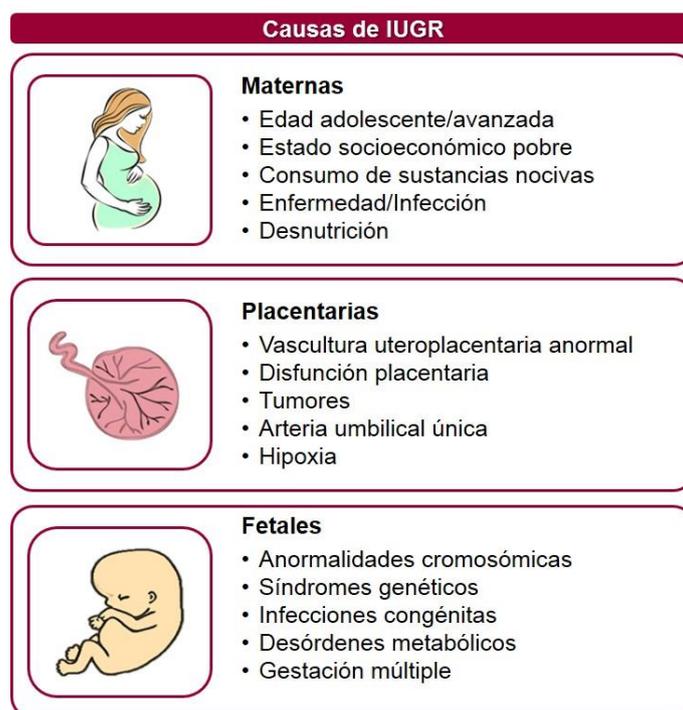
2.4.2 Restricción del crecimiento intrauterino

La restricción del crecimiento intrauterino (IUGR), se ha definido como la tasa de crecimiento fetal que está por debajo de lo normal, tomando en cuenta el potencial de crecimiento específico según la raza y el sexo del feto (Brodsky and Christou, 2004; Cohen et al., 2016; Rizzo and Arduini., 2016). También se ha descrito como una reducción en el patrón de crecimiento fetal esperado y suele resultar en múltiples efectos adversos en el feto (Sharma et al., 2016). En un neonato normal, un peso al nacer de entre 2500-4000gr (Jin, 2015) y está entre el percentil 10 y el 90 según la edad gestacional, el género y la raza. Se considera IUGR un neonato por debajo del percentil 10 (Faraci et al., 2011). El IUGR afecta aproximadamente al 3-10% de todos los recién nacidos, llegando

a ser incluso seis veces mayor en países en vías de desarrollo o subdesarrollados (Sharma et al., 2016).

Después de la prematuridad, IUGR es la segunda causa de muerte perinatal. El IUGR también aumenta el riesgo de asfixia intraparto, parto prematuro y riesgos asociados incluyendo el síndrome de dificultad respiratoria, la hemorragia intraventricular y la enterocolitis necrotizante (Pallotto and Kilbride, 2006; von Beckerath et al., 2013). Los efectos del IUGR a menudo también afectan la vida infantil y adulta. Durante la infancia, existe un mayor riesgo de parálisis cerebral, baja estatura y deterioro del neurodesarrollo (Pallotto and Kilbride, 2006; von Beckerath et al., 2013). El IUGR también se asocia a programación fetal, habiéndose demostrado que las personas que habían tenido IUGR, presentaban una mayor incidencia de HTA, diabetes, obesidad, enfermedad arterial coronaria, accidente cerebrovascular y síndrome metabólico (Barker, 2006). En los países en vías de desarrollo, la principal causa de IUGR es la malnutrición mientras que en los países desarrollados la principal causa es la insuficiencia placentaria (Marsal, 2002). Se han descrito diversas causas del desarrollo de IUGR; estas pueden ser maternas, placentarias y/o fetales y se resumen en la Figura 2.

Figura 2. Causas de restricción del crecimiento intrauterino



IUGR, restricción del crecimiento intrauterino.

3. Nutrición en el embarazo

Está bien establecido que el entorno de la vida uterina influye en el desarrollo fetal y la salud posterior en la edad adulta y que la nutrición materna es un importante estímulo ambiental de programación.

Para el asesoramiento nutricional durante la gestación se recomienda un enfoque individualizado que considere la accesibilidad de la mujer a los alimentos, su estado socioeconómico, la raza y la etnia, las elecciones culturales de alimentos y el índice de masa corporal. Además, muchas de las recomendaciones nutricionales conocidas están orientadas a embarazos sin complicaciones, por lo que es necesario realizar ajustes cuando éstas surjan.

3.1. Requerimientos nutricionales en el embarazo

Durante el embarazo, la ingesta calórica debe aumentar en aproximadamente 300 kcal/día. Este valor se deriva de una estimación de 80,000 kcal necesarias para lograr un embarazo a término y no solo explica el aumento del metabolismo materno y fetal, sino también el crecimiento fetal y placentario. Los requisitos de energía varían significativamente según la edad, el IMC y el nivel de actividad de la mujer.

Las recomendaciones para la ingesta diaria de micronutrientes en una mujer embarazada están determinadas por los "aportes dietéticos recomendados" o datos de RDA. La Tabla 1 muestra las recomendaciones para la mayoría de las vitaminas y minerales durante el embarazo.

Tabla 1. Recomendaciones para la ingesta de micronutrientes

Micronutrientes	No E	E	Micronutrientes	No E	E
Vitamina A (µg/d)	700	770	Vitamina B6 (mg/d)	1.3	1.9
Vitamina D (µg/d)	5	15	Vitamina B12 (µg/d)	2.4	2.6
Vitamina E (mg/d)	15	15	Vitamina C (mg/d)	75	85
Vitamina K (µg/d)	90	90	Calcio (mg/d)	1,000	1,000
Folato (µg/d)	400	600	Hierro (mg/d)	18	27
Niacina (mg/d)	14	18	Fósforo (mg/d)	700	700
Riboflavina (mg/d)	1.1	1.4	Selenio (µg/d)	55	60
Tiamina (mg/d)	1.1	1.4	Zinc (mg/d)	8	11

Recomendaciones diarias para una embarazada mayor de 18 años. Tabla modificada de Kominarek y Rajan, 2016. E, Embarazadas

Respecto a las recomendaciones de macronutrientes, no hay modificaciones sustanciales de los carbohidratos, ya que la proporción debe estar entre 45-64% de las calorías totales similar a la de una mujer no gestante. Respecto de la fibra, las recomendaciones sugieren una ingesta diaria de 25-35 gr. Sin embargo, se recomienda aumentar la ingesta de proteínas durante el embarazo, especialmente durante el segundo y tercer trimestres (Trumbo et al., 2002). La ingesta proteica pasa de 0.8 g/kg/día a 1.1 g/kg/día (WHO, FAO, UNU, 2007; Trumbo et al., 2002). Por otro lado, la ingesta de grasa debe comprender 20-35% de las calorías diarias, similar a las mujeres no embarazadas. Sin embargo, en el embarazo, para un buen desarrollo fetal, la calidad de la grasa es más importante que su cantidad, por esta razón es necesario mejorar la proporción relativa de las grasas poliinsaturadas (Marangoni et al., 2016).

3.2 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

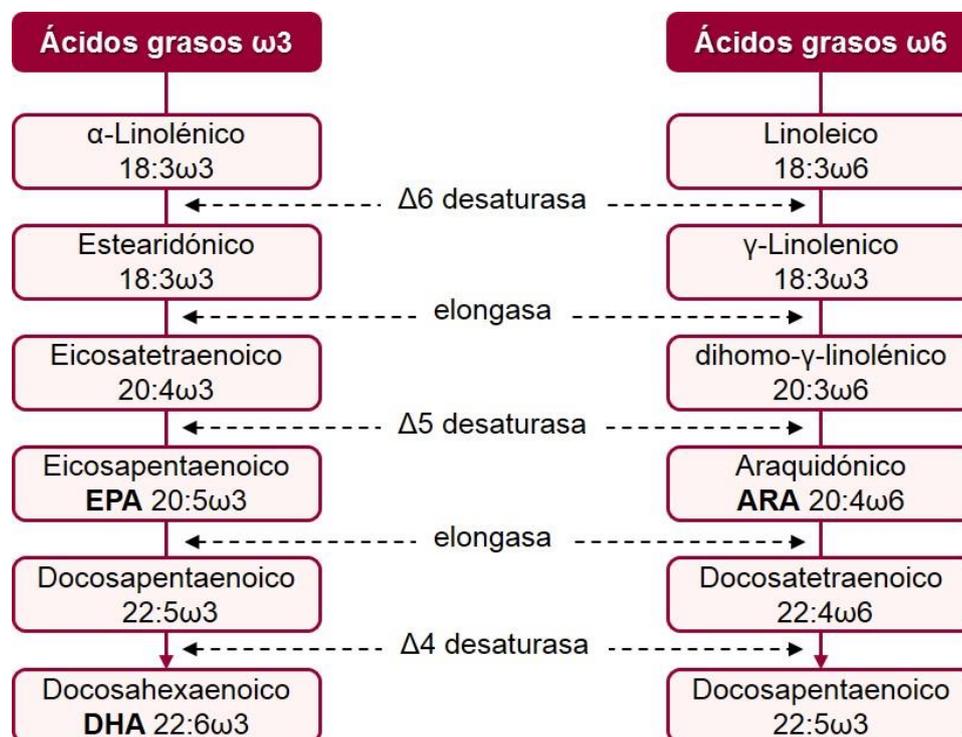
Durante el embarazo son de vital importancia los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFA, long chain polyunsaturated fatty acids). Estos ácidos grasos contienen 18-20 carbonos o más, y pueden clasificarse en dos familias principales: ω 6 (n-6) y ω 3 (n-3), dependiendo de la posición del primer doble enlace del extremo metilo del ácido graso (Venegas-Calderón et al., 2010). Los principales LCPUFA ω 3 son el ácido α -linolénico (ALA) (18:3 ω 3), el ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6 ω 3) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) (20:5 ω 3), mientras que los ω 6 LCPUFA incluyen el ácido linoleico (LA) (18:2 ω 6) y el ácido araquidónico (ARA) (20:4 ω 6).

3.2.1 Síntesis de LCPUFA ω 3 y ω 6

En el ser humano el LA y ALA son ácidos grasos esenciales ya que el organismo no puede sintetizarlos, por lo que se consideran esenciales y es necesario ingerirlos en la dieta. Además, no se pueden sintetizar uno a partir del otro. La fuente de los LCPUFA ω 6 son fundamentalmente los alimentos de origen vegetal y la fuente de los ω 3 son fundamentalmente el pescado azul y algunos alimentos de origen vegetal (semillas).

El LA da origen al ARA, y el ALA da origen al EPA y al DHA. El EPA y el ARA usan la misma vía metabólica, compitiendo entre ellos por las mismas enzimas en la formación de sus productos derivados (Figura 3).

Figura 3. Esquema de la síntesis de los LCPUFA



3.2.2 Funciones de los LCPUFA

ARA y DHA son componentes importantes de los fosfolípidos de la membrana celular (Jump, 2002). El ARA se distribuye ampliamente en los fosfolípidos de todas las membranas celulares, mientras que el DHA está en alta concentración en los fosfolípidos de la membrana de las células del sistema nervioso central. Ambos tienen un papel importante en el mantenimiento de la fluidez, permeabilidad y conformación de la membrana celular y, de esta manera, determinan funciones importantes de la misma. Además, sirven como precursores de moléculas de señalización (por ejemplo, eicosanoides y docosanoides) y actúan como mediadores intracelulares de la expresión génica (Duttaroy, 2000; Lauritzen et al., 2015). Hay que destacar que los ω 6 y ω 3 son metabólicamente distintos y ejercen algunas acciones opuestas en la respuesta inflamatoria. En concreto, los eicosanoides y leucotrienos, que derivan del ARA tienen acción protrombótica y proinflamatoria, mientras los sintetizados a partir

del EPA tienen acción vasodilatadora y antiinflamatoria (Calder, 2009). Por ello, la proporción de ω_6 y ω_3 en la dieta puede modular la respuesta inflamatoria, siendo importante un balance dietético de la proporción de ácidos grasos ω_6 y ω_3 (Gow and Hibbeln, 2014).

El cambio a través de los años a la dieta occidental ha causado un cambio drástico en la proporción de ácidos grasos ω_6 y ω_3 siendo aproximadamente de 20:1 en algunas poblaciones (Russo, 2009; Gómez Candela et al., 2011). Este desequilibrio de LCPUFA ω_6 : ω_3 puede influir en el crecimiento fetal.

3.2.3 Transferencia de LCPUFA a través de la placenta

Durante el embarazo, los tejidos maternos, fetales y de la placenta requieren niveles más altos de estos ácidos grasos. Sobre todo, en el último trimestre los requerimientos fetales de ARA y DHA son especialmente altos debido a la rápida síntesis de tejido cerebral. Como la eficiencia de conversión de ARA, DHA y EPA a partir de sus precursores es muy baja en el feto, la captación directa desde la madre es muy importante para un desarrollo y crecimiento fetal adecuado (Innis, 2005). El tejido placentario desempeña un papel clave en el transporte preferencial de LCPUFA al feto que resulta en el enriquecimiento selectivo en la circulación fetal conocido como "biomagnificación" (Gil-Sánchez et al., 2012). Aunque estos ácidos grasos pueden difundir, su transporte hacia el feto durante la gestación se consigue por la acción de varias proteínas de transporte placentario tales como la translocasa de ácidos grasos, la proteína de unión a ácidos grasos de la membrana plasmática y la proteína de transporte de ácidos grasos (Duttaroy, 2004; Gil-Sánchez et al., 2012).

La disminución en la biodisponibilidad o el transporte de LCPUFA, particularmente el ARA y el DHA, está relacionado con alteraciones en el crecimiento fetal. Por ejemplo, el IUGR está vinculado con cambios en el ratio materno-fetal de LCPUFA que impiden un inadecuado aporte al feto en desarrollo, lo que sugiere un papel importante de estos nutrientes en la patogénesis de IUGR (Cetin et al., 2002). En los embarazos con IUGR, la proporción de los niveles plasmáticos fetales ARA y DHA y sus precursores LA y ALA, es significativamente menor en relación con el plasma materno (Cetin et al., 2002). Las diferencias observadas en el ratio feto-materno de ácidos grasos

en embarazos con IUGR podría ser el resultado de un suministro transplacentario inadecuado.

Hasta la fecha, gran parte del interés en la suplementación con ácidos grasos y el desarrollo fetal ha sido enfocado en ácidos grasos ω 3, particularmente DHA probablemente asociado al desequilibrio en la dieta que presenta deficiencia de este LCPUFA (Makrides et al., 2011). Sin embargo, es extremadamente importante considerar otros ácidos grasos como los ω 6 (ARA) en la dieta materna (Innis, 2005).

Por lo tanto, antes de planificar cualquier suplementación de LCPUFA durante el embarazo, es importante considerar lo siguiente: a) los efectos individuales de los ácidos grasos ω 3 y ω 6, y b) el equilibrio entre los ácidos grasos ω 3 y ω 6 en la dieta materna (Mennitti, 2015).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Justificación. El bajo peso al nacer es un marcador de un inadecuado desarrollo fetal. Entre otras causas, está relacionado con dietas pobres o desequilibradas durante la gestación que pueden dar lugar a un insuficiente aporte de nutrientes al feto. Un bajo peso al nacer está asociado, no sólo con mayor morbilidad perinatal, sino que también es un factor de riesgo de enfermedad cardiometabólica en la edad adulta. La incidencia de bajo peso al nacer está en aumento, tanto en países desarrollados como subdesarrollados, lo que supone un problema de importancia clínica global.

En esta tesis nos centraremos en analizar cómo modificaciones en la nutrición durante el periodo gestacional (restricción nutricional global o suplementación con ARA+DHA), afectan al crecimiento fetal y la implicación de la placenta en estos procesos. El conocimiento generado sobre la relación entre la nutrición materna y el bajo peso al nacer, es relevante para poder prevenir el desarrollo de enfermedades cardiometabólicas en la edad adulta.

Hipótesis. Alteraciones del estado nutricional durante la gestación interfieren con el crecimiento fetal mediado por un estado pro-oxidativo de la placenta.

Objetivo general. Evaluar la influencia de una reducción de la ingesta y de la suplementación con ARA+DHA durante la gestación sobre el desarrollo fetal, analizando el papel de la placenta y el sexo.

Objetivo I. Evaluar los efectos de una restricción del 50% de la ingesta durante la segunda mitad de la gestación sobre la rata gestante, la placenta y el feto, analizando:

1. *En la madre*

- Cambios en el peso y metabolismo (disponibilidad de macronutrientes)
- Niveles plasmáticos de corticosterona
- Estado oxidativo plasmático, evaluando antioxidantes y biomarcadores de daño oxidativo

2. *En la placenta*

- Cambios en el peso y metabolismo (disponibilidad de macronutrientes)
- Estado oxidativo, evaluando la expresión de las principales enzimas implicadas y biomarcadores de daño oxidativo
- Niveles de factor de crecimiento placentario
- Papel del sexo en las alteraciones encontradas

3. *En el feto*

- Parámetros de crecimiento (peso, longitud)
- Peso de órganos relacionados con la regulación cardiovascular (corazón, riñón)
- Niveles plasmáticos de corticosterona
- Papel del sexo en las alteraciones encontradas

Objetivo II. Evaluar la influencia de la suplementación con ARA+DHA durante la gestación sobre la rata gestante, la placenta y el feto, analizando:

1. *En la madre*

- Cambios en el peso y metabolismo (disponibilidad de macronutrientes)
- Niveles plasmáticos de corticosterona
- Estado oxidativo plasmático, evaluando antioxidantes y biomarcadores de daño oxidativo

2. *En la placenta*

- Cambios en el peso y metabolismo (disponibilidad de macronutrientes)
- Biomarcadores de daño oxidativo
- Papel del sexo en las alteraciones encontradas

3. *En el feto*

- Parámetros de crecimiento (peso, longitud)
- Peso de órganos relacionados con la regulación cardiovascular (corazón, riñón)
- Niveles plasmáticos de corticosterona
- Papel del sexo en las alteraciones encontradas

MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelos experimentales

Los experimentos se realizaron en ratas Sprague-Dawley de la colonia mantenida en las instalaciones del animalario de la Universidad Autónoma de Madrid (ES-28079-0000097). Todos los procedimientos experimentales fueron llevados a cabo bajo supervisión del Gabinete Veterinario de la Universidad Autónoma de Madrid y fueron aprobados por el Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad Autónoma de Madrid, de acuerdo con la Guía de Uso y Cuidado de Animales de Laboratorio (National Institutes of Health publication no. 85-23, revised in 1996), la Legislación Española (RD 1201/2005) y de la Directiva 2010/63/UE relativa a la protección de animales utilizados para fines científicos.

Los animales fueron alojados en cubetas de Makrolon tipo III, con las siguientes dimensiones: 36.5 cm de largo, 21.5 cm de ancho y 18.5 cm de alto. Las cubetas se situaron en habitaciones con temperatura regulada (19-23°C), humedad relativa controlada (35-45%) y fotoperiodo 12h luz/12h oscuridad.

En esta Tesis se han llevado a cabo dos modelos experimentales, utilizando diferentes intervenciones nutricionales en la rata gestante, que se describen a continuación. En el primer modelo se indujo una desnutrición durante la gestación, y en el segundo se administró una dieta experimental suplementada con una combinación de LCPUFA (ARA+DHA).

El método utilizado para conocer el día de cubrición fue colocar a la pareja en una cubeta con fondo de rejilla sobre papel de filtro. La mañana siguiente al día de la cópula, se pudo observar la presencia de tapón vaginal mucoso en el suelo de la cubeta. En ese momento, se separó a la hembra del macho y se consideró como día 1 de la gestación (G1), asignándose la rata a uno de los grupos control o experimental.

Modelo de desnutrición (Maternal undernutrition, MUN). Este modelo experimental ha sido ampliamente utilizado en nuestro laboratorio, habiendo sido demostrado previamente que este modelo programa el desarrollo de HTA en la edad adulta, únicamente en los descendientes macho.

Una vez determinado el día G1, las ratas se asignaron al grupo control o al grupo MUN. Todas las ratas gestantes tuvieron dieta *ad libitum* durante la primera mitad de la gestación (días 1-10). En el grupo control, las ratas mantuvieron su dieta *ad libitum*, el resto de la gestación y en el grupo MUN, la cantidad de pienso se redujo al 50% durante la segunda mitad (días 11 hasta el 20). Para calcular la cantidad de pienso que debíamos administrar al grupo MUN, se llevaron a cabo experimentos preliminares para evaluar la ingesta normal de una rata gestante, determinándose que dicha ingesta era de un máximo de 24 g de pienso diarios. La dieta que se administró durante todo el periodo gestacional fue el pienso de cría para rata y ratón EURodent 22% 5LF5 de LabDiet, cuya composición es de 55% carbohidratos, 22% proteína, 4.4% lípidos, 4.1% fibra y 5.4% minerales. El agua de bebida fue suministrada *ad libitum* en ambos grupos.

Modelo de suplementación con dieta experimental (Experimental diet, ED). El segundo modelo experimental, consistió en dar a las ratas, durante toda la gestación, una dieta suplementada con ácidos grasos ARA+DHA, (ED). Las ratas asignadas al grupo control recibieron dieta EURodent 22% 5LF5 de LabDiet. En ambos casos la dieta y el agua se administró *ad libitum* durante toda la gestación.

La dieta experimental fue preparada específicamente para este estudio por TestDiet[®] Company (USA), basada en la composición de la dieta EuroRodent 22% 5LF5. La modificación consistió en reemplazar el aceite de soja (que es la fuente de lípidos de este pienso) por el compuesto Formulaid[™] (2:1) (DSM Nutritional Products, Suiza), de manera que la dieta se mantuviera isocalórica. Formulaid[™] (2:1) es un aceite vegetal, utilizado en productos de suplementación infantil, procedente de hongos y microalgas en forma de triglicéridos, conteniendo 2 partes de ácido araquidónico (ARA, 20:4w6) y 1 parte de ácido docosahexaenóico (DHA, 22:6w3); este aceite también contiene ascorbil palmitato (250 ppm) y tocoferoles (250-500 ppm) como antioxidantes.

Las dietas control y ED fueron isocalóricas y sin diferencias en el contenido de proteínas, carbohidratos, lípidos, fibra o minerales. El contenido de ARA, DHA y sus precursores en las dietas fue, analizado mediante cromatografía de gases

y espectrofotometría de masas (GS/MS) por el método de Carnielli et al., 1996 (Tabla 2).

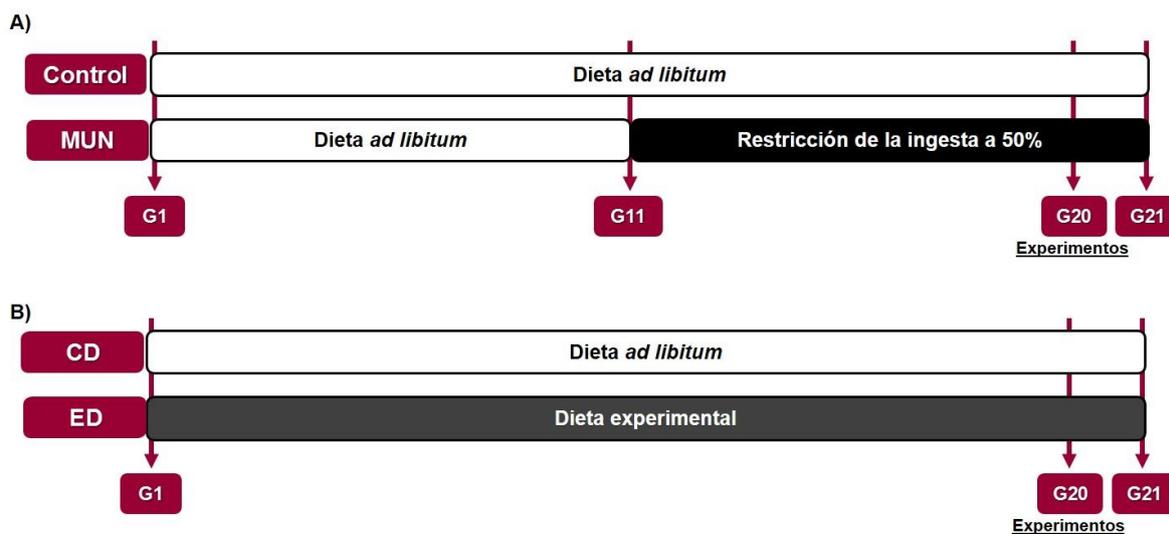
Tabla 2. Contenido de ácidos grasos en las dietas y en el compuesto Formulaid™

Ácidos grasos	Formulaid™	ED	CD
Láurico (12:0)	2.5	1.3	-
Mirístico (14:0)	6.2	3.1	0.1
Palmítico (16:0)	11.7	14.2	16.3
Palmitoleico (16:1w7)	0.9	0.5	0.2
Estearico (18:0)	5.9	4.5	2.7
Oléico (18:1w9)	24.0	20.8	20.4
Linoleico (18:2w6)	5.4	27.5	53.5
Linolénico (18:3w6)	1.9	1.0	-
α-linolénico (18:3w3)	1.0	3.0	4.6
Araquídico (20:0)	0.5	0.4	0.3
Gadoleico (20:1w9)	0.2	0.2	0.3
Eicosadienoico (20:2w6)	0.4	0.2	-
Eicosatrienoico (20:3w6)	1.8	0.9	-
Araquidónico (20:4w6)	26.1	13.5	-
Eicosapentaenoico (20:5w3)	0.3	0.1	-
Behenico (22:0)	0.9	0.5	-
Docosahexaenoico (22:6w3)	10.3	6.3	-
Lignocérico (24:0)	0.6	0.4	-

Composición de ácidos grasos por determinados mediante espectrofotometría de masas. Los datos se expresan como porcentaje del total de ácidos grasos. ED, dieta experimental, CD dieta control.

Se realizó un cálculo de la cantidad diaria aproximada de ARA y DHA ingerida por la rata ED. Para ello se tuvo en cuenta que la dieta contiene 4.4% de lípidos, la proporción relativa de ARA y DHA (Tabla 2) y la ingesta diaria de aproximadamente 24 gr de pienso al día. Con estos parámetros se calculó que las ratas ingieren 141.75 mg/día de ARA y 66.15 mg/día de DHA. Considerando que las ratas tienen un peso aproximado de 350 gr, se estimó que la ingesta kd/día está en 405 mg/kg/día para ARA y de 189 mg/kg/día de DHA.

En la figura 4 se muestra un esquema de los dos modelos experimentales utilizados en esta tesis.

Figura 4. Modelos experimentales utilizados en el estudio

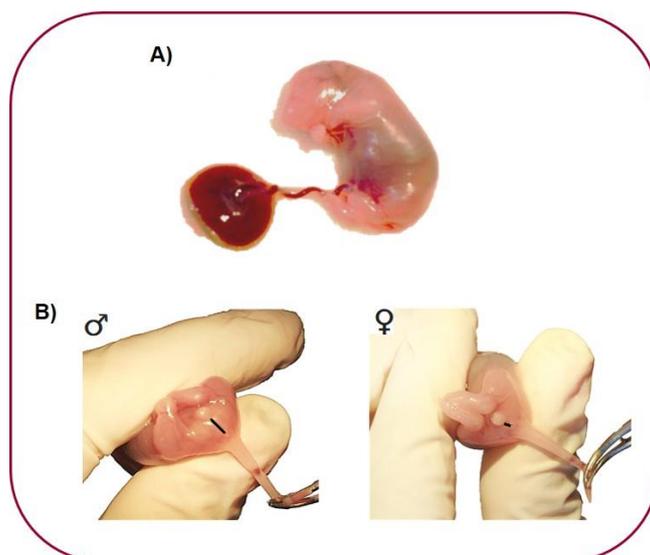
A) modelo de desnutrición gestacional y B) modelo de suplementación con dieta experimental. MUN, maternal undernutrition; CD, dieta control; ED, dieta experimental. G1, G11, G20, G21, días 1, 11, 20 y 21 de la gestación, respectivamente.

2. Diseño experimental

Se empleó el mismo diseño para ambos modelos experimentales. En el día 20 de gestación (G20), las ratas fueron anestesiadas mediante inhalación de CO₂. Posteriormente se obtuvo una muestra de sangre materna (6ml; en tubos eppendorf que contenían heparina sódica al 1%) mediante punción cardíaca.

Tras el sacrificio de los animales por desangrado, se extrajeron los fetos. Para ello, se colocó a la rata en posición de decúbito supino, se rasuró el vientre desde la apófisis xifoides hasta la región genital. Posteriormente se realizó una laparotomía media con exteriorización del útero para actuar directamente sobre el mismo, realizándose histerectomía. Comenzando por el cuerno derecho, las unidades feto-placentarias fueron extraídas una a una, separándose primero la placenta para ser pesada y congelada rápidamente (-80°C) y después cada feto, que fue sexado, pesado y medida su longitud. Posteriormente, los fetos se sacrificaron mediante decapitación, se recolectó sangre en tubos eppendorf con heparina y se prosiguió a la disección del corazón y riñón, los cuales fueron pesados.

Para sexar los fetos, se observó la zona perianal, y se evaluó la distancia entre la papila genital y la apertura anal, esta distancia es mayor en machos que en hembras (Figura 5).

Figura 5. Determinación del sexo de los fetos

A) Fotografía de un feto con su placenta y cordón umbilical y B) Fotografías que muestran las diferencias entre machos y hembras que permiten el sexado. La línea negra muestra la distancia entre la papila genital y la apertura anal.

En los tejidos maternos, placentarios y fetales obtenidos se realizaron los distintos protocolos experimentales que se explican en el apartado siguiente para obtener las variables a analizar (Tabla 3).

Tabla 3. Determinaciones maternas, fetales y en placenta a día G20

VARIABLES	MADRE	PLACENTA	FETO
Antropométricas	<ul style="list-style-type: none"> • Peso 	<ul style="list-style-type: none"> • Peso 	<ul style="list-style-type: none"> • Peso • Longitud
Matabólicas	<ul style="list-style-type: none"> • Glucemia • Proteínas • LCPUFA 	<ul style="list-style-type: none"> • Proteínas • LCPUFA 	
Hormonales	<ul style="list-style-type: none"> • Corticosterona 		<ul style="list-style-type: none"> • Corticosterona
Estado oxidativo	<ul style="list-style-type: none"> • SOD • Catalasa • GSH • Tioles • MDA+HNE • Carbonilos 	<ul style="list-style-type: none"> • p22^{phox} • NADPH • Xantina oxidasa • Cu/Zn-SOD • Mn-SOD • Ec-SOD • Catalasa • MDA+HNE • Carbonilos • PGF 	

LCPUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; SOD, superóxido dismutasa; GSH, glutatión reducido; MDA, malondialdehído; HNE 4-hydroxy-2-nonenal; PGF, factor de crecimiento placentario.

3. Métodos experimentales

3.1 Medidas corporales

El día G20, el peso de las ratas gestantes se determinó previo al sacrificio en una báscula (Denver Instrument SI-8801). En los fetos, se midió el peso corporal así como los pesos de corazón y riñón (Balanza analítica PCE-AB Clase I). Los pesos de los órganos fetales se relativizaron al peso corporal fetal. La longitud corporal de los fetos se realizó midiendo desde la cabeza a la cola, colocándolos sobre un papel de filtro, con un calibre digital (Conecta Nessler Spain).

3.2 Procesamiento de muestras de sangre

De la sangre materna obtenida, se utilizó una gota para medir la glucemia mediante un glucómetro (Accu-check Aviva, Roche) a las 14:00 p.m. El resto de sangre materna se colocó en tubos eppendorf que contenían heparina y se centrifugó a 10.000 rpm, 4°C durante 10 minutos. El plasma obtenido se alicuotó y se congeló a -80°C, hasta su posterior utilización. Debido al poco volumen de sangre que se pudo obtener de los fetos por decapitación, se realizó un pool de sangre de varios fetos hembra y varios fetos macho de cada camada. La obtención de plasma se realizó de la misma forma que en la rata madre.

3.3 Procesamiento de tejido placentario

El tejido placentario (previamente congelado), se homogenizó de manera diferente en función de las determinaciones que se fueran a realizar (proteínas y daño oxidativo, Western Blot o LCPUFA).

Para la determinación de proteínas y daño oxidativo, el tejido congelado se homogenizó con un poltrón, utilizando 200mg de tejido, en tampón Tris 20mM (Tris 1mM: 6,05g de trizma en 30 ml de agua Milli-Q Plus, pH 7.4; Tris 20mM: 2 ml de tris 1M en 98 ml de agua Milli-Q Plus). Una vez homogenado, se centrifugó a 10.000 rpm, 4°C durante 10 minutos y se extrajo el sobrenadante, el cual fue alicuotado y congelado la posterior medida de proteínas y del daño oxidativo.

3.4 Determinación de proteínas en plasma y placenta

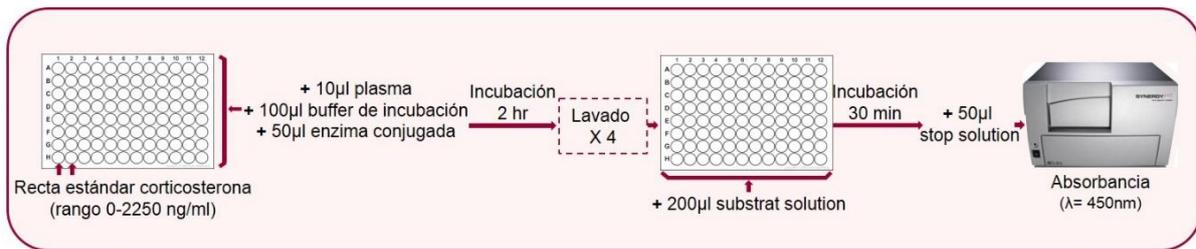
El contenido de proteínas de las muestras de plasma y placenta se midió empleando el método de Bradford adaptado a un lector de placas. De acuerdo al protocolo descrito por el fabricante, se hizo reaccionar 10 μL de muestra diluida con 200 μL del reactivo de Bradford (colorante de azul Coomassie, Bio-Rad, España) diluido 1:4 y después de 5 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader, Biotek, VT, USA). La concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se estimó a partir de una recta de calibrado con albúmina de suero de bovino, en el rango de 0.0- 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

3.5. Niveles plasmáticos de corticosterona

Para la cuantificación de corticosterona se siguieron las indicaciones del fabricante (Corticosterone rat/mouse ELISA kit; DV9922, Demeditec). El principio de este kit consiste en un ensayo en fase sólida de inmunoabsorción unido a enzimas, basado en el principio de unión competitiva. Brevemente, la cantidad, desconocida, de corticosterona presente en la muestra compete con una cantidad conocida de corticosterona conjugada con peroxidasa de rábano, por los sitios de unión del anticuerpo de la corticosterona presente en los pocillos de una microplaca.

Protocolo experimental

Se cargaron 10 μL de cada punto de la recta estándar (15, 50, 185, 640 y 2250 ng/ml) y de plasma en una placa de 96 pocillos, posteriormente se añadieron 100 μL de buffer de incubación a y 50 μL de enzima conjugada a cada uno de los pocillos y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. En seguida se lavaron los pocillos 4 veces con wash solution. Se añadieron 200 μL de substrat solution y se incubó la placa durante 30 minutos en oscuridad. Por último, se añadieron 50 μL de stop solution a cada pocillo y se determinó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (SynergyTM HT, BioTek, UK) (Figura 6).

Figura 6. Protocolo experimental de corticosterona

Cálculos

La concentración de la hormona en la muestra es inversamente proporcional a la densidad óptica medida. Para el cálculo de resultados se utilizaron los valores de absorbancia de cada muestra y se determinó la concentración de cada una de ellas a partir de la curva estándar.

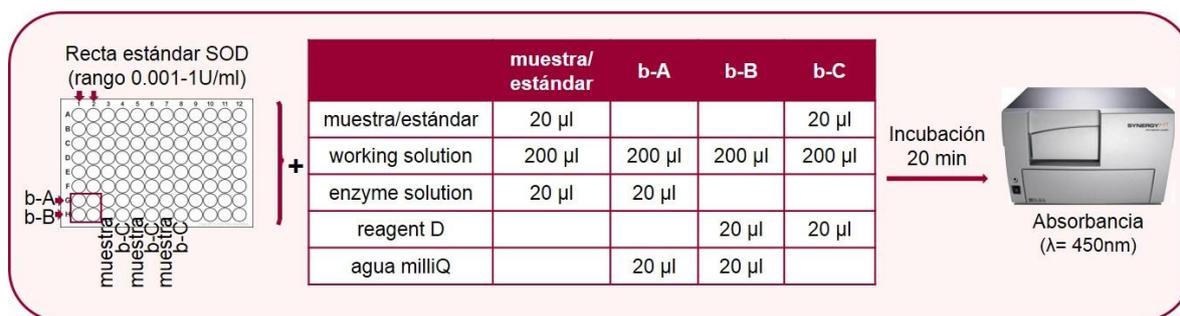
3.6 Medida de parámetros de estrés oxidativo

3.6.1 Actividad superóxido dismutasa (SOD)

Para su análisis, se siguieron las instrucciones del fabricante (SOD Activity Assay kit; KB-03-011, BQCKit). Este kit utiliza una sal tetrazolio (WST-1) para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina. Una unidad de SOD es definida como la cantidad de enzima necesaria para exhibir la dismutación del 50% de radical superóxido.

Protocolo experimental

Para medir la SOD con este kit, se utilizan tres blancos (blanco A, B y C) y a cada uno se le añaden soluciones diferentes, de la siguiente manera. En una placa de 96 pocillos, se cargan 20 µl de la curva estándar de SOD (0.001, 0.01, 0.05, 0.1 y 1U/ml), también se cargaron 20 µl de plasma en el blanco C y 20 µl de agua Milli-Q Plus en los blancos A y B. Posteriormente se añadieron 200 µl de working solution a todos los pocillos y 20 µl de la enzyme solution al blanco A y a cada pocillo de la muestra de plasma. En seguida se incubó la placa a 37°C por 20 minutos y se leyó la absorbancia a 450 nm en un lector de placas (SynergyTM HT, BioTek, UK) (Figura 7).

Figura 7. Protocolo experimental de SOD

SOD, superóxido dismutasa; b-A, blanco A; b-B, blanco B; b-C, blanco C

Cálculos

Para calcular la actividad SOD de los plasmas se utilizó la ecuación 1 obtenida por regresión lineal de la curva estándar reemplazando los valores de % de inhibición por cada muestra.

Ecuación 1

Actividad SOD (% Inhibición)

$$= \frac{[(ABS_{blanco A} - ABS_{blanco B}) - (ABS_{muestra/estándar} - ABS_{blanco C})]}{(ABS_{blanco A} - ABS_{blanco B}) * 100}$$

ABS, absorbancia.

3.6.2 Actividad catalasa

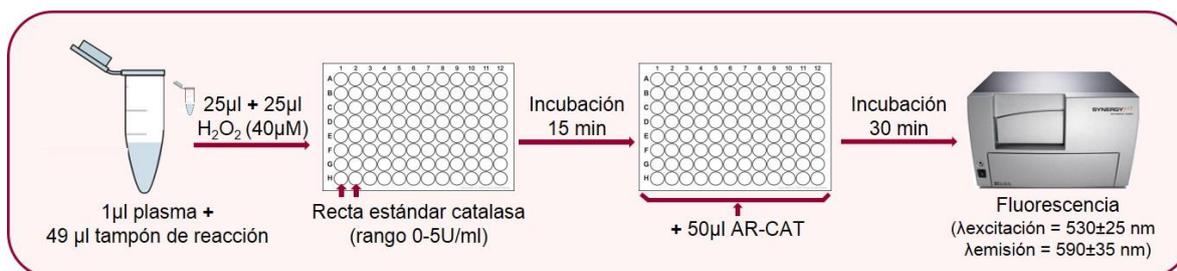
La actividad de la catalasa se cuantificó empleando el método fluorimétrico basado en la oxidación de la sonda Amplex Red producida por el H_2O_2 en presencia de HRP. La catalasa cataliza la descomposición del H_2O_2 en H_2O y, por tanto, es capaz de inhibir la oxidación de la sonda, siendo la fluorescencia que se detecta inversamente proporcional a la actividad de la catalasa presente en la muestra.

Protocolo experimental

Preparamos el tampón de reacción (Tris Base 1X, pH = 7.5 disuelto en agua Milli-Q Plus). Posteriormente en una placa de 96 pocillos, se cargaron 25 µl de plasma diluido en tampón de reacción (1:50, v/v) y 25 µl de tampón de reacción como blanco. Se añadieron 25 µl de H_2O_2 (40 µM, disuelto en tampón de reacción), se incubó la placa a 37°C durante 15 minutos, trascurrido este tiempo, se agregaron 50 µl del reactivo AR-CAT (25 µl de sonda Amplex® Red

10 mM, disuelto en Dimetilsulfóxido; 10 µl de HRP 100 U/ml, disuelto en tampón de reacción; 2.65 ml de tampón de reacción) a cada uno de los pocillos, la placa se volvió a incubar a 37°C durante 30 minutos. Se procedió a leer la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35 \text{ nm}$) en un lector de placas (SynergyTM HT, BioTek, UK) (Figura 8).

Figura 8. Protocolo experimental de medición de actividad catalasa



AR-CAT, sonda Amplex[®] Red, peroxidasa y tampón de reacción.

Cálculos

La actividad catalasa plasmática se expresó en U/mg de proteína total, estimada a partir de la recta estándar de calibrado de la catalasa, cargando 25 µl de diluciones seriadas de catalasa de hígado bovino 12660 U/mg en tampón de reacción en el rango de 0.625 a 5 U/ml. La recta estándar se obtuvo por análisis de regresión lineal de los datos de inhibición de la fluorescencia obtenida según la ecuación 2 frente a la concentración de catalasa en U/mg de proteína total.

Ecuación 2

$$\text{Inhibición de Fluorescencia} = 1 - \frac{\text{Fluorescencia}_{\text{muestra/catalasa}}}{\text{Fluorescencia}_{\text{blanco}}}$$

*Fluorescencia*_{blanco}, fluorescencia en ausencia de catalasa.

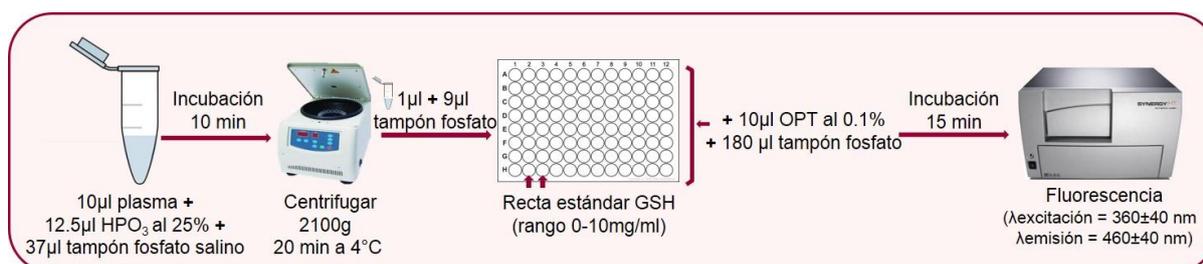
3.6.3 Glutatión reducido (GSH)

El nivel de GSH se cuantificó empleando un método espectro-fluorimétrico, basado en la interacción específica entre el OPT y el GSH, que produce una intensa señal de fluorescencia.

Protocolo experimental

Se preparó tampón fosfato salino (0.1 M, pH=8) con EDTA (5 mM) y HPO_3 al 25 % (p/v diluido en agua Milli-Q Plus). Se mezclaron 10 μl de plasma con 12.5 μl de HPO_3 al 25% y 37 μl de tampón fosfato salino. Posteriormente, se incubaron las muestras durante 10 minutos en frío y se centrifugaron a 2100 g durante 20 minutos a 4°C. Se cargó, en una placa de 96 pocillos, 1 μl del sobrenadante y se le añadieron 9 μl de tampón fosfato salino. Se cargó un volumen de 10 μl de diluciones de GSH en tampón fosfato como recta estándar. Se añadieron a todos los pocillos 180 μl de tampón fosfato salino y 10 μl de OPT al 0.1% (p/v diluido en metanol). Tras incubar la muestra y los reactivos a temperatura ambiente y en obscuridad durante 15 minutos, se leyó la fluorescencia ($\lambda_{\text{excitación}} = 360 \pm 40 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{emisión}} = 460 \pm 40 \text{ nm}$) en un lector de placas (Synergy™ HT, BioTek, UK) (Figura 9).

Figura 9. Protocolo experimental de medición de glutatión reducido



HPO_3 , ácido metafosfórico, OPT, O-Ftaldehído.

Cálculos

La cuantificación de glutatión total se expresó en mg de GSH/mg de proteína total, el cual se estimó a partir de la recta estándar de calibrado de GSH (rango 0-10 mg/ml) descrita en el protocolo experimental y del contenido de proteínas totales de la muestra. Las unidades se expresaron en mg GSH/mg de proteína.

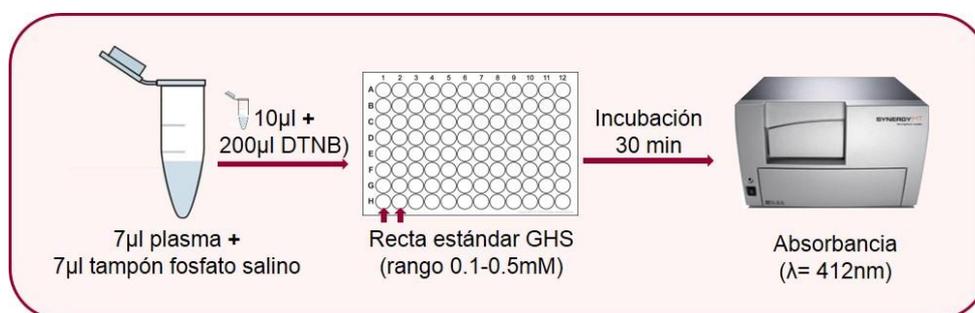
3.6.4 Grupos tioles

Los grupos tiólicos son capaces de reaccionar con el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico, DTNB) generando el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), el cual puede ser cuantificado a 412 nm en un espectrofotómetro UV/visible (Hawkins et al., 2009).

Protocolo experimental

En una placa de 96 pocillos, se cargaron 10 μ l de muestra de plasma diluida en tampón fosfato salino (1:2, v/v; pH = 7.4) y se añadieron 200 μ l de DTNB (0.5 mM, diluido en tampón fosfato salino). Se cargaron 10 μ L de disoluciones de glutatión reducido (GSH) como curva estándar (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 mM). En seguida se agitó la placa durante 1 minuto y posteriormente se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos en oscuridad. Se leyó la absorbancia a 412 nm en un lector de placas (Synergy™ HT, BioTek, UK) (Figura 10).

Figura 10. Protocolo experimental de medición de grupos tioles



DTNB, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico; GSH, Glutatión reducido.

Cálculos

La cuantificación de tioles se estimó a partir de una recta estándar cargando 10 μ l de diluciones de GSH reducido en el rango de 0.1 a 0.5 mM. El nivel de tioles se expresó en mM de GSH/mg de proteína total, el cual se estimó a partir de la recta estándar de calibrado del GSH y del contenido de proteína de la muestra.

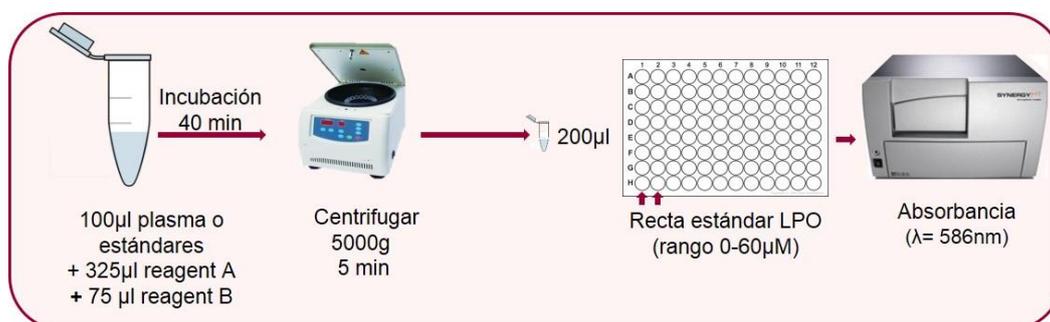
3.6.5 Peroxidación lipídica

Para su análisis, se siguieron las instrucciones del fabricante (Lipid Hydroperoxide Assay kit; KB-03-001, BQCKit). En este ensayo, un indol reacciona rápidamente con el MDA y 4HNE en medio ácido, produciendo un cromóforo con un alto coeficiente de extinción molar con absorción máxima a 586 nm.

Protocolo experimental

En tubos eppendorff se añadieron 325 μ l de reagent A (indol), 100 μ l de plasma/placenta o estándares y 75 μ l de reagent B. Estos tubos se incubaron durante 40 minutos a 40°C. Posteriormente se centrifugaron a 10000 rpm por 5 minutos a 21°C. Se transfirieron 200 μ l del sobrenadante de cada tubo a una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 586 nm en un lector de placas (Synergy™ HT, BioTek, UK).

Figura 11. Protocolo experimental de LPO



LPO, MDA malondialdehído + HNE 4-hidroxialqueno

Cálculos

La cuantificación de MDA+HNE se estimó a partir de la curva estándar y la concentración se expresó en μ mol/ml.

3.6.6 Proteínas carboniladas

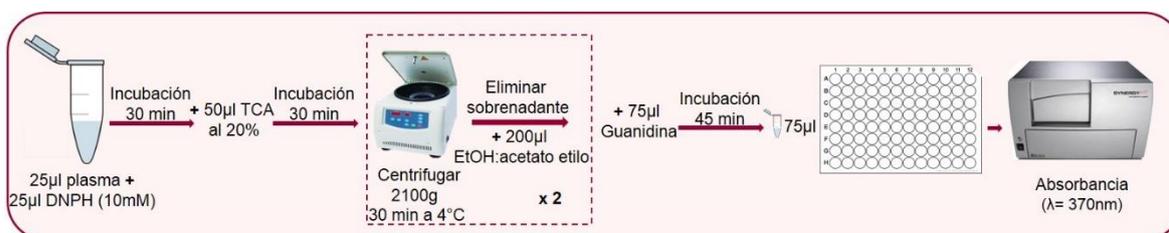
La cantidad de proteínas carboniladas plasmáticas y en placenta se midió de acuerdo al método basado en la DNPH (Hawkins et al. 2009). La DNPH reacciona con grupos carbonilos formados en las proteínas mediante procesos oxidativos. El compuesto formado es capaz de absorber a 370 nm y ello constituye una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

Protocolo experimental

Se mezclaron 25 μ l de plasma o placenta con 25 μ l de DNPH (10 mM, disuelto en HCl 2.5 M, v/v disuelto en agua Milli-Q Plus). La mezcla se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 minutos. Cada 5 minutos los tubos se agitaron en un vórtex para favorecer la reacción entre los grupos

carbonilos y el DNPH. Las proteínas plasmáticas totales se precipitaron en frío con ácido tricloroacético (20% p/v) durante 30 minutos. Mediante centrifugación a 2100 g durante 30 minutos a 4 °C, se obtuvieron los precipitados proteicos, los cuales se lavaron con 200 µl de una mezcla fría de etanol absoluto/acetato de etilo (1:1, v/v) para eliminar el exceso de DNPH y se volvieron a centrifugar a las mismas condiciones (el paso de lavado se repitió dos veces). A continuación, los pellets se disolvieron en 75 µl de hidrocloreuro de guanidina (6 M, p/v disuelto en agua Milli-Q Plus). Las muestras se incubaron durante 45 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Se cargaron 75 µl de la muestra en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 370 nm en un lector de placas (Synergy™ HT, BioTek, UK) (Figura12).

Figura 12. Protocolo experimental de medición de proteínas carboniladas



DNPH, 2,4-Dinitrofenilhidrazona; TCA, Ácido Tricloroacético; EtOH, Etanol absoluto.

La concentración de proteínas carboniladas totales (PCT) se determinó mediante la ecuación 3 y se expresaron en nmol/mg de proteína total.

Ecuación 3

$$PCT = \left(\frac{ABS_{370\text{ nm}}}{\epsilon_{DNPH} * b} \right) * 10^6$$

ϵ_{DNPH} , coeficiente de extinción del DPNH ($22000\text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$); $ABS_{370\text{ nm}}$, absorbancia a 370 nm; b , altura del líquido en el pocillo de la placa (0.195 cm).

3.7 Estudio de la expresión de proteínas mediante Western Blot en placenta

3.7.1 Procesamiento de las muestras de tejido placentario

El tejido placentario se homogenizó con un politrón. Se utilizaron 100 mg de tejido en 500 µl de tampón de lisis (0,42 mM NaCl, 1 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 1mM DTT, 20mM HEPES, 20mM NaF, 1mM Na_3VO_4 , 1mM EDTA, 1mM EGTA, 20%

glicerol, 2mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo, 1µl/ml leupeptina, 1µl/ml aprotinina, y 0,5µl/ml N-α-p-tosil-l-lisina en clorometilcetona. El homogenado se sometió a 3 choques térmicos consecutivos (congelación en nitrógeno líquido y descongelación en baño a 37°C). Posteriormente, se centrifugó durante 30 min a 10.000 rpm a 4°C y se recogió el sobrenadante.

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

3.7.2. Detección de proteínas por Western Blot

En primer lugar, se hicieron ensayos preliminares para determinar la concentración óptima de carga de la muestra, que fue de 30 µg/µL o 50 µg/µL, en función del anticuerpo utilizado. En cada experimento las muestras se ajustaron a la concentración óptima con reactivo Laemli (50 mM Tris, pH = 6.8), 10% glicerol, 10% SDS, 5% β-mercaptoetanol, 2mg/ml azul de bromofenol). A continuación las proteínas presentes en la muestra se separaron mediante electroforesis, utilizando un sistema Mini Protean 3 (Bio-Rad, EE.UU.). Para ello, tras hervir la muestra en un baño a 100°C durante 5 min, ésta se cargó en un gel de acrilamida/bisacrilamida al 10, 12 o 15% de acrilamida en función del peso molecular de la proteína a detectar. Como marcador de pesos moleculares se utilizó Precision Plus Protein™, All blue standard (BIO-RAD, España).

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

Una vez finalizada la transferencia, las membranas se lavaron 2 veces durante 5 min y otro lavado de 10 min en agitación, con una solución de lavado (0.1 % leche en polvo desnatada en tampón fosfato salino con 0.5% Tween 20 (PBS-T). Seguidamente, se incubaron durante 1h en agitación con una solución de bloqueo (5% leche en polvo desnatada en PBS-T), con el fin de evitar las

uniones inespecíficas. A continuación, las membranas se lavaron de nuevo 2 veces durante 5 min y otro lavado de 10 min y se incubaron a 4°C durante 24h con el anticuerpo primario correspondiente, preparado en una solución específica (0.5% BSA, PBS-T y 0.05% azida).

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

Por último, se llevó a cabo la detección de las distintas proteínas por quimioluminiscencia, incubando la membrana con el kit de detección (ECL Prime, Amersham Bioscience, Reino Unido) durante 1-5 min y posterior exposición en un sistema de detección y adquisición de imagen ChemiDoc XRS (Bio-Rad, EE.UU.).

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

Determinación de la expresión de las proteínas productoras de anión superóxido: NADPH oxidasa y xantina oxidasa (XO). Para el análisis de la subunidad p22phox de la NADPH oxidasa (22 KDa) se utilizaron geles de acrilamida al 15 % [H₂O (2.4ml), 1.5M Tris-HCl pH=8,8 (2.5ml), 20% SDS (50µl); acrilamida/bisacrilamida al 30% (5ml), 10% amonio persulfato (50µl), TEMED (5 µl)]. Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo policlonal de conejo contra la subunidad p22phox (1:500, Santa Cruz Biotechnology, Alemania). Como anticuerpo secundario (Ig G) se utilizó un anticuerpo anti-conejo marcado con peroxidasa (1:5000, Amersham Bioscience, Reino Unido). En la misma membrana se determinó la expresión de actina como control de carga. Para la determinación de la XO (150 KDa) se utilizó un gel de acrilamida al 12%. Las membranas se incubaron con un anticuerpo primario policlonal de conejo contra la proteína xantina oxidasa (1:1000, Santa Cruz Biotechnology,

Alemania). Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-conejo (1:5000, Amersham Bioscience, Reino Unido).

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

Determinación de la expresión de enzimas antioxidantes: *Cu/Zn SOD* (20-30 KDa), *Mn-SOD*(25 KDa), *Ec-SOD* (30-35 KDa) y *catalasa* (60 KDa). La expresión de estas enzimas se determinó utilizando geles de acrilamida al 15%. Como anticuerpos primarios se utilizaron un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína Cu/Zn-SOD (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Alemania), un anticuerpo primario monoclonal de ratón contra la proteína Mn-SOD (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, Alemania), un anticuerpo primario policlonal de conejo contra la proteína EC-SOD (1:1000, Enzo Life Sciences, EE.UU) y un anticuerpo primario monoclonal de ratón contra la proteína catalasa (1:2000, Sigma Aldrich, EE.UU). Como anticuerpos secundarios (IgG) anti-conejo (1:5000, Sigma-Aldrich), o anti-ratón (1:5000, Amersham Bioscience, Reino Unido), dependiendo del anticuerpo primario, marcados con peroxidasa.

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

3.8 Medición de LCPUFA en plasma y placenta

3.8.1 Procesamiento de las muestras de tejido placentario

Para homogenizar la placenta, se disolvió una pastilla de cOplete™, cocktail inhibidor de proteasas (Roche) en 10 ml de solución fisiológica al 0.9%. Se pesaron 200 mg de tejido y se homogenizaron en 2 ml de solución fisiológica con el inhibidor de proteasas. Posteriormente el homogenado se sonicó 3 veces a velocidad máxima durante 10 segundos, 7, seguidamente, se centrifugó a 13.000rpm durante 10 minutos a 4°C. Se tomó el sobrenadante y se congeló a -80°C para su posterior uso.

3.8.2 Extracción de lípidos del plasma y de la placenta

La extracción de los lípidos del plasma se realizó mediante el método modificado de Folch (Folch et al., 1957). Todos los reactivos usados fueron obtenidos de Merck (Darmstadt, Alemania). En tubos de ensayo pyrex®, se añadieron 200 µl de plasma/tejido y se adicionaron los estándares: 20 µl de C9-C17 FFA (1mg/ml en cloroformo) para ácidos grasos libres en plasma y tejido; 20 µl de C9-C15 PL (1ml/ml en cloroformo) para fosfolípidos y 20 µl de C9-C15 TG (1mg/1ml en cloroformo) para triglicéridos, estos dos últimos solo en el plasma. Se añadieron 3.8 ml de cloroformo/metanol (2:1, vol/vol) y se agitaron vigorosamente durante 10 minutos con un vórtex. Posteriormente a cada probeta se le añadió 0.8 ml de solución saturada de NaCl y se agitaron vigorosamente otra vez por 10 minutos. Seguidamente, se centrifugaron a 3.000 rpm por 10 minutos, se extrajo la fase orgánica y se colocó en probetas pyrex®. A la fase acuosa remanente en los tubos de ensayo, se le añadieron 2 ml de cloroformo, se agitaron, centrifugaron y se extrajo el sobrenadante. Las probetas se colocaron en un incubador de bloque seco a 37°C y se esperó a que el cloroformo se evaporara y solo quedaran los lípidos.

En los plasmas, los lípidos se resuspendieron en 100 µL de cloroformo y con una jeringa Hamilton de 100 µl se depositaron en una placa de TLC (thin layer chromatography; Merck, Darmstadt, Alemania). Las fracciones de fosfolípidos, ácidos grasos libres y triglicéridos del plasma fueron separadas usando heptano, éter diisopropílico y ácido acético (60:40:3, vol) como fase móvil (Carnielli et al., 1996). Después de la visualización de estos componentes del plasma con 2',7'-diclorofluoresceína, las bandas con las fracciones lipídicas se rasparon de la placa de TLC y se transfirieron a tubos de vidrio de 4 ml equipados con tapas de rosca revestidas de teflón.

Tras la separación de las fracciones lipídicas del plasma y de la placenta, el procedimiento para la metilación fue el mismo en ambos casos. Se añadieron 2 ml de ácido clorhídrico metanólico a cada tubo (3 ml en tejido) y se incubaron a 100°C durante 1 hora. Posteriormente se añadieron 2 ml de K₂CO₃ al 10% (3 ml en tejido) para neutralizar las muestras. Por último se añadieron 200 µl de hexano a cada tubo (400 µl en tejido) y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 10 minutos. Se extrajo el sobrenadante y se colocó en un vial para cromatografía.

Las muestras se mantuvieron a -20°C hasta su inyección en el gas cromatógrafo (Hewlett Packard 5890 II).

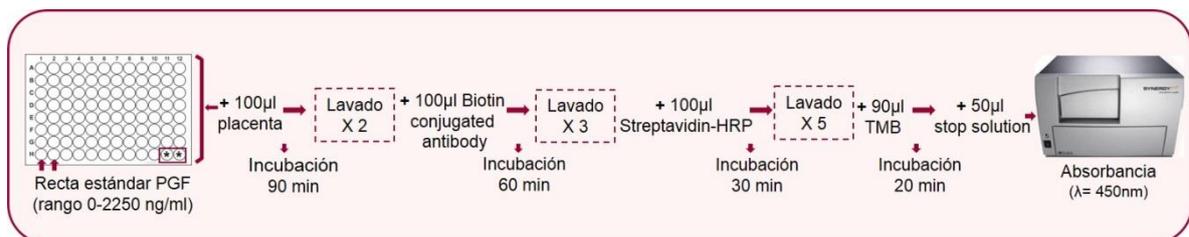
3.9 Determinación del factor de crecimiento placentario en la placenta

Para su análisis, se utilizó un kit (Rat Placenta Growth Factor ELISA kit; abx256213, abbexa) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Este kit es un ELISA- sándwich.

Protocolo experimental

Se cargaron 100 μl de cada punto de la recta estándar (7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 pg/ml), de las muestras de placenta y del buffer de dilución (control cero) en la placa de 96 pocillos. Posteriormente se realizó una incubación a 37°C durante 90 minutos. Seguidamente, se lavó la placa dos veces con el buffer de lavado y se añadieron 100 μl de la solución de biotín conjugated antibody a todos los pocillos y se incubó a 37°C por 60 minutos. Después se lavó la placa 3 veces, se añadieron 100 μl de la solución streptavidin-HRP y se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación se lavó la placa 5 veces, se añadieron 90 μl del substrato TMB a cada pocillo y se incubó la placa a 37°C por 20 minutos. Tras esta última incubación, se añadieron 50 μl de la stop solution y se leyó la absorbancia a 450nm en un lector de placas (SynergyTM HT, BioTek, UK) (Figura 13).

Figura 13. Protocolo experimental de PGF



PGF, factor de crecimiento placentario; * control cero

Cálculos

Los niveles de PGF se calcularon a partir de la curva estándar y se expresaron en pg/ml .

4. Análisis estadístico

El tamaño muestral se calculó basándonos en la variabilidad de los datos. Respecto a los biomarcadores plasmáticos de estado oxidativo se tomó como referencia la variable grupos carbonilo, que por experiencia previa es el parámetro que presenta mayor variabilidad. En concreto se ha estimado que los valores de desviación estándar para este parámetro están entre 0,2 y 0,5 nmol/mg proteína. Para detectar diferencias significativas entre las medias de los grupos de aproximadamente 0,4 nmol/mg proteína, el tamaño muestral necesario se ha calculado en un mínimo de 8 animales por cada grupo de comparación. En estudios previos de nuestro grupo, la enzima con mayor variabilidad fue la xantina oxidasa; para los estudios de Western Blot, se estimó la desviación de esta enzima en un 25%, se estimó un tamaño muestral de 5 animales por grupo. Todos los cálculos de tamaño de muestra se realizaron considerando un 15% de pérdidas.

Los datos de las variables que mostraron una distribución normal se mostraron como la media \pm error típico. Los datos de variables que no mostraron una distribución normal fueron expresados como la mediana \pm el rango intercuartílico. Los datos como de variables cualitativas se expresaron en frecuencias relativas (%). Se utilizó la prueba T de Student para la comparación de medias entre grupos y la prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes no paramétricas. Las asociaciones entre variables cualitativas se determinaron mediante correlaciones de Pearson. Las comparaciones entre grupos de los resultados obtenidos se realizaron mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA); para comparaciones múltiples se empleó la prueba de Bonferroni. Se determinaron las asociaciones entre variables cualitativas mediante correlaciones de Pearson. Las comparaciones de los resultados obtenidos entre grupos se realizaron mediante el análisis de la varianza de una vía (ANOVA); para comparaciones múltiples se empleó la prueba de Bonferroni. Un modelo de regresión lineal nos permitió estimar el peso de los fetos.

En todos los casos se empleó una potencia estadística del 80% y para detectar diferencias estadísticamente significativas, se consideró una probabilidad de error tipo alfa del 5%.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa SPSS Statistics versión 24 (IBM Company). La representación gráfica se realizó mediante el programa GraphPad Prism 5 (GraphPad software, CA, USA).

RESULTADOS

RESULTADOS

I. RESTRICCIÓN NUTRICIONAL EN LA GESTACIÓN

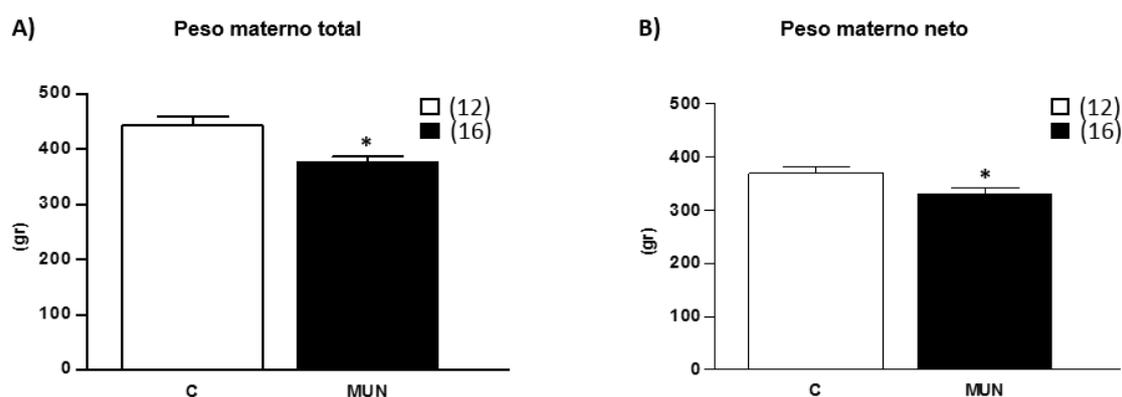
Todos los resultados que se presentan a continuación corresponden a datos obtenidos a día 20 de gestación (G20).

1. Parámetros de las ratas gestantes

1.1 Peso

Las ratas MUN y control pesaban lo mismo al inicio de la gestación. Sin embargo, a día G20, las ratas MUN tuvieron un peso significativamente menor a las ratas control (Figura 1A). De igual manera, tras la extracción de los fetos y de la placenta, el peso de las ratas MUN fue significativamente menor al de las ratas control (Figura 14 B).

Figura 14. Peso materno

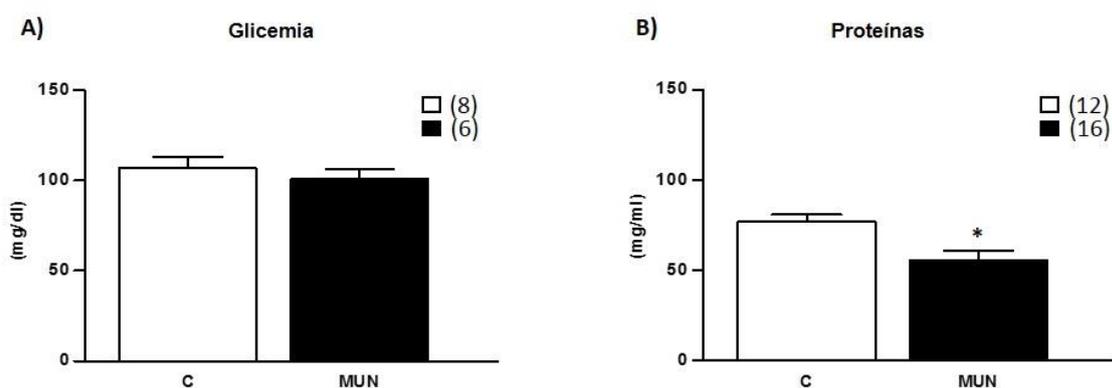


C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$. Prueba *T de Student*.

El número de crías por camada en las ratas C fue de 15 (rango 11-17) mientras que en las ratas MUN fue de 14 (rango 11-19).

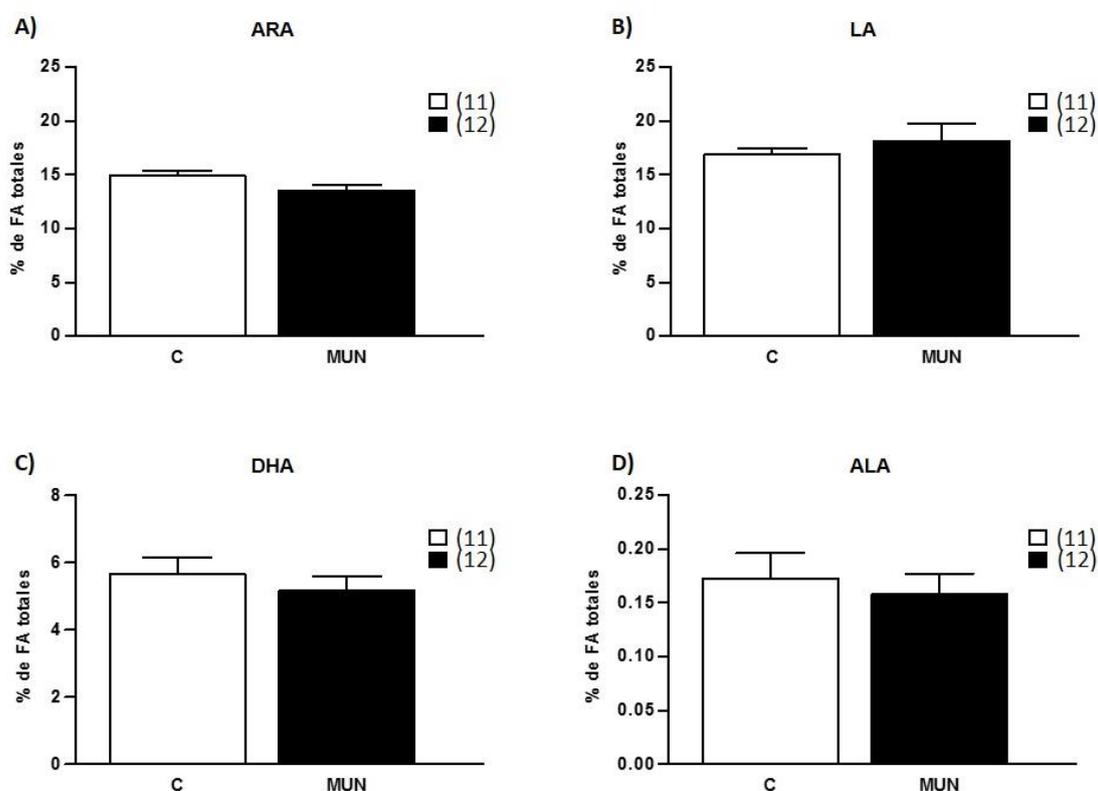
1.2 Macronutrientes en plasma

Glucemia y proteínas. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de glucemia entre las ratas MUN y control (Figura 15A). Las proteínas plasmáticas fueron significativamente menores en las ratas MUN que en las ratas C (Figura 15B).

Figura 15. Glucemia y proteínas plasmáticas

C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$. Prueba *T de Student*.

Ácidos grasos de cadena larga (LCPUFA). No se encontraron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de ARA, DHA ni de sus precursores LA y ALA entre las ratas MUN y C (Figura 16).

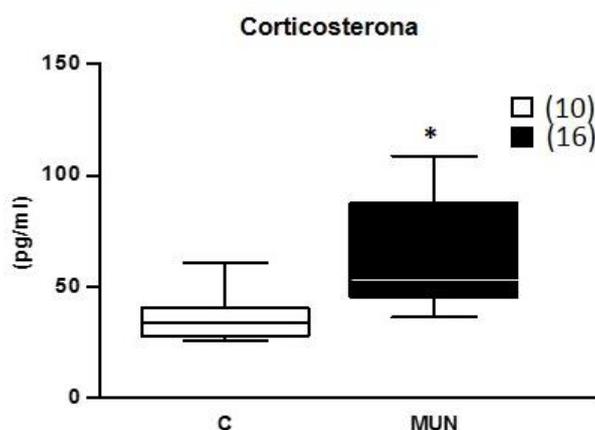
Figura 16. Niveles de LCPUFA en plasma materno

C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional; FA ácidos grasos; ARA, ácido araquidónico; LA, ácido linoleico; DHA, ácido docosahexaenoico; ALA, ácido α -linolénico. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. Prueba *T de Student*.

1.3 Corticosterona plasmática

Los niveles en plasma de corticosterona fueron significativamente mayores en las ratas MUN respecto a las ratas control (Figura 17).

Figura 17. Niveles plasmáticos de corticosterona



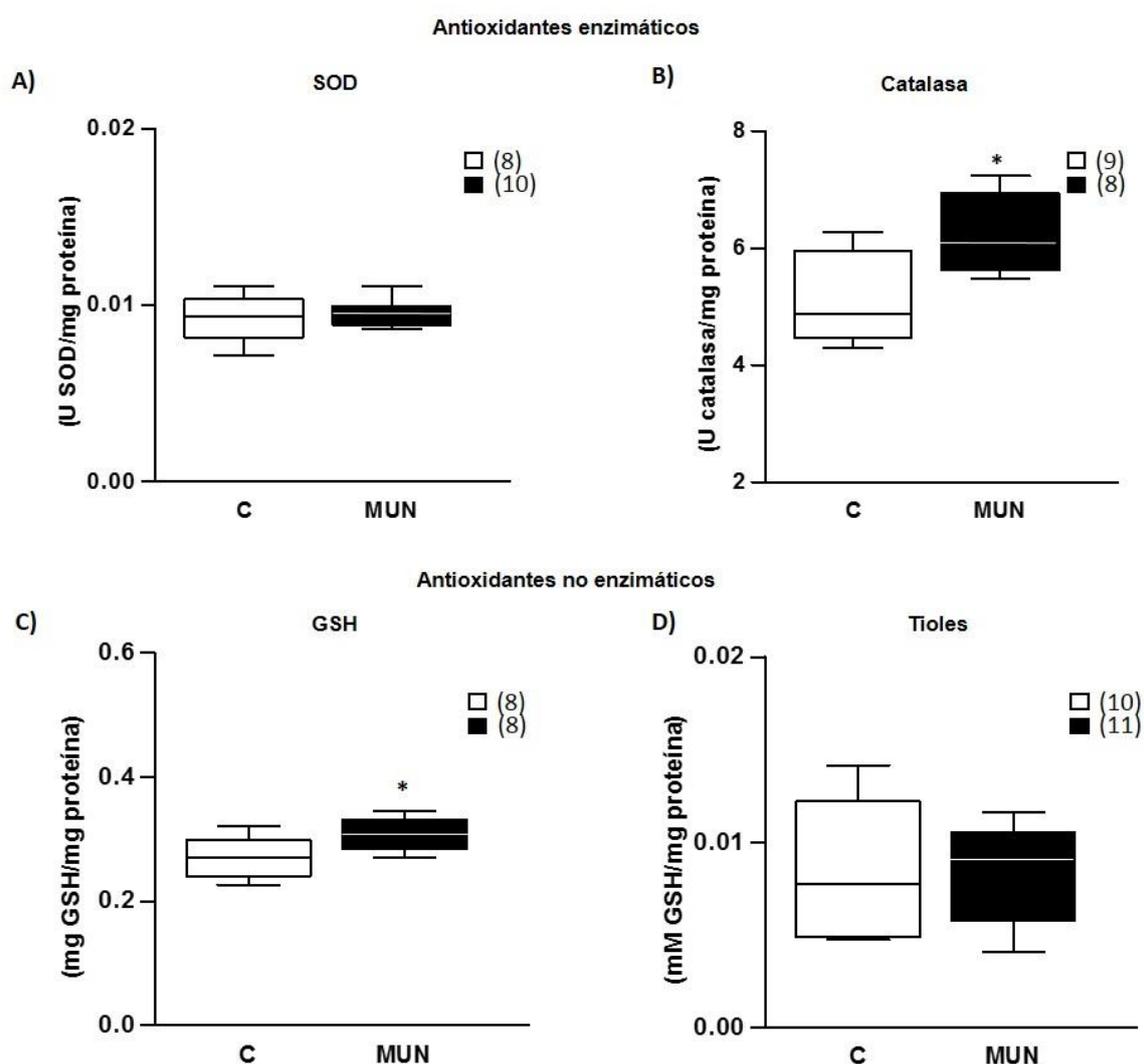
C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartílico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$. Prueba *U* de Mann-Whitney.

1.4 Biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo

1.4.1 Antioxidantes

Antioxidantes enzimáticos. No se encontraron diferencias significativas en la actividad superóxido dismutasa (SOD) entre los grupos MUN y C (Figura 18A). La actividad catalasa fue significativamente mayor en el grupo MUN respecto al control (Figura 18B).

Antioxidantes no enzimáticos. Los niveles plasmáticos de glutatión reducido (GSH) fueron significativamente mayores en el grupo MUN respecto al grupo C. Los grupos tioles no presentaron diferencias significativas entre los grupos MUN y C (Figura 18C y D).

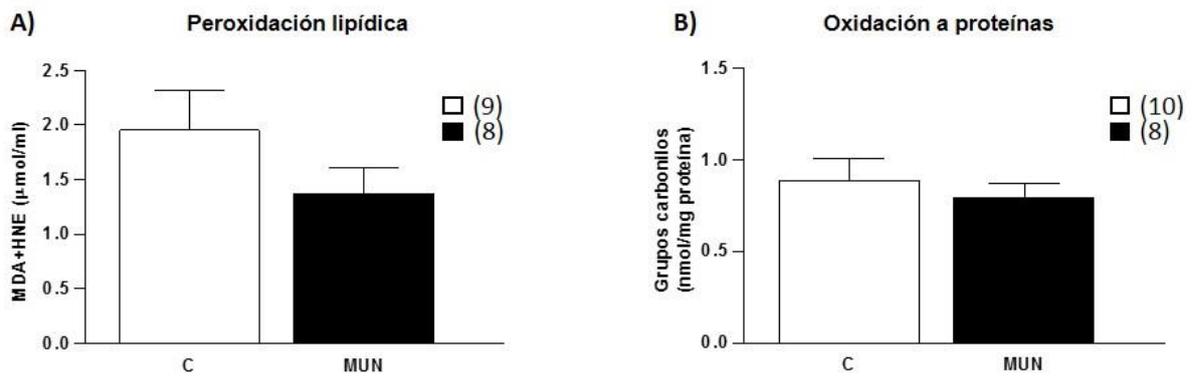
Figura 18. Niveles plasmáticos de antioxidantes

C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional; SOD, Superóxido dismutasa; GSH, Glutación reducido. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartílico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$. Prueba *U de Mann-Whitney*.

1.4.2 Daño oxidativo

Daño oxidativo a lípidos. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de malondialdehído (MDA) y de 4-hidroxinonenal (HNE) entre los grupos MUN y control (Figura 19A).

Daño oxidativo a proteínas. No se observaron diferencias significativas en los niveles de proteínas carboniladas entre los grupos MUN y control (Figura 19B).

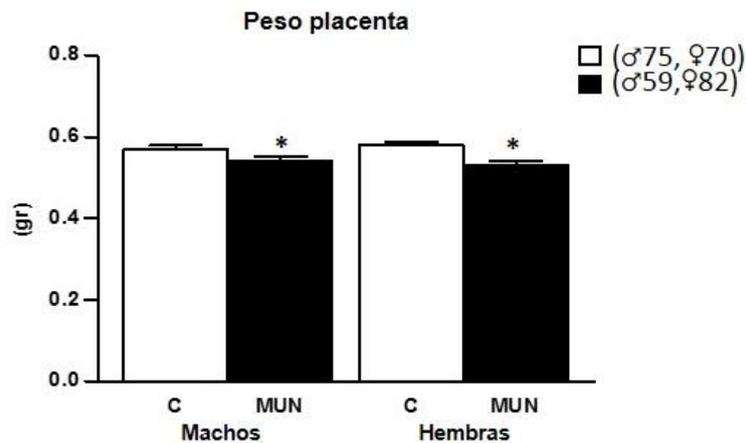
Figura 19. Niveles plasmáticos de daño oxidativo

C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. Prueba *T de Student*.

2. Parámetros placentarios

2.1 Peso

El peso de las placentas del grupo MUN, tanto de los machos como de las hembras, fue significativamente menor que el de sus respectivos controles (Figura 20).

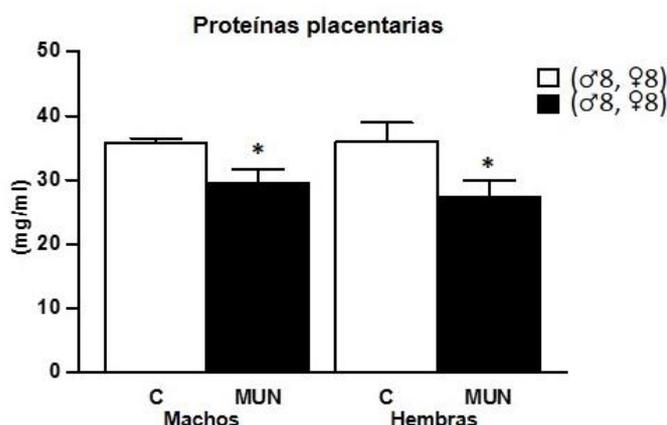
Figura 20. Peso de la placenta

C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. Prueba *T de Student*.

2.2 Macronutrientes en la placenta

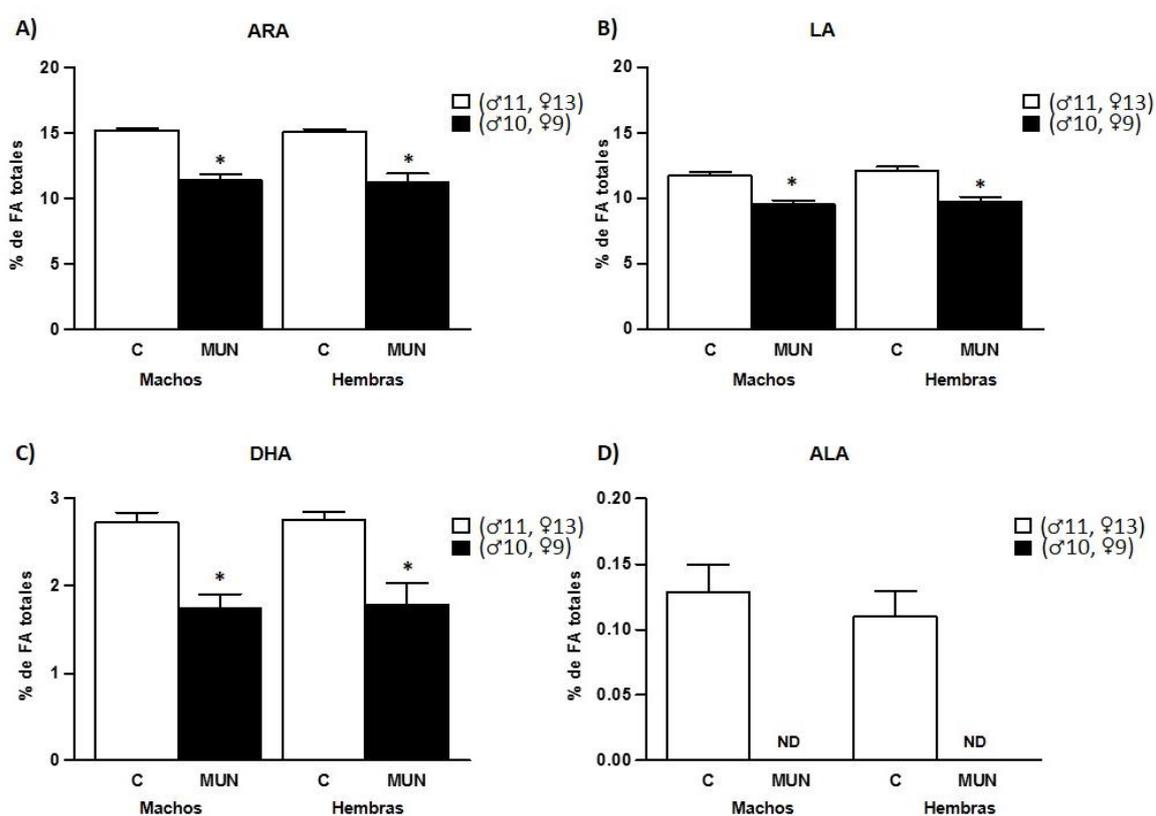
Proteínas. Los niveles de proteínas en la placenta del grupo MUN, tanto en machos como hembras, fueron significativamente menores que en sus respectivos controles (Figura 21).

Figura 21. Proteínas placentarias



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. Prueba *T de Student*.

Ácidos grasos de cadena larga (LCPUFA). Los ácidos grasos ARA, DHA y el LA (precursor de ARA) se encontraron en niveles significativamente menores en las placentas del grupo MUN, tanto machos como hembras, en comparación a sus controles (Figura 22A-C). El ácido graso ALA (precursor de DHA) estaba presente en las placentas del grupo C pero no en las del grupo MUN (Figura 22D).

Figura 22. Niveles de LCPUFA en la placenta

C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional; FA ácidos grasos; ARA, ácido araquidónico; LA, ácido linoleico; DHA, ácido docosahexaenoico; ALA, ácido α -linolénico. Los datos representan la media \pm error típico. ND, no detectado. Entre paréntesis número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. Prueba *T de Student*.

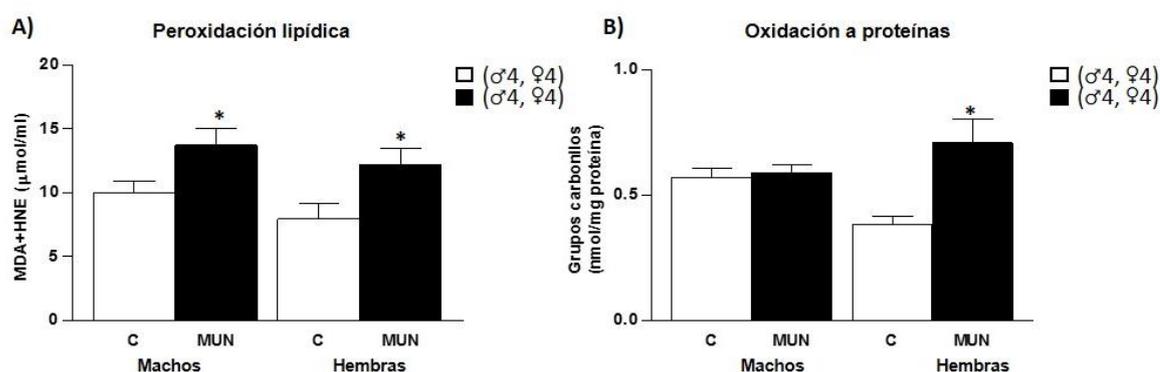
2.3 Biomarcadores de estrés oxidativo en la placenta

2.3.1 Daño oxidativo

Daño oxidativo a lípidos. Los niveles de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE) en las placentas de machos y hembras del grupo MUN fueron significativamente mayores respecto a las de su correspondiente sexo del grupo C (Figura 23A).

Daño oxidativo a proteínas. Los niveles de proteínas carboniladas en placentas de hembras MUN fueron significativamente mayores que en hembras C, no detectándose diferencias entre las placentas macho de ambos grupos (Figura 23B).

Figura 23. Daño oxidativo en placenta



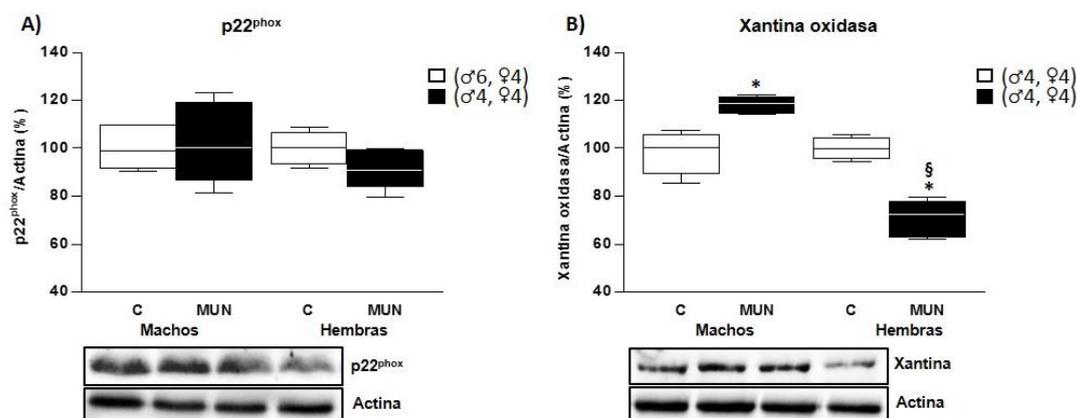
C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. Prueba *T de Student*.

2.3.2 Expresión de enzimas productoras de radicales libres

NADPH oxidasa. No se encontraron diferencias significativas en la expresión de la subunidad $p22^{\text{phox}}$ de la NADPH en las placentas, tanto machos como hembras, de los grupos MUN y C (Figura 24A).

Xantina oxidasa. La expresión de xantina oxidasa fue significativamente mayor en las placentas de los machos del grupo MUN respecto a sus controles, mientras que las placentas hembras MUN presentaron valores significativamente menores respecto a sus controles. A su vez, en el grupo MUN la expresión de xantina oxidasa fue significativamente menor en las hembras que en los machos (Figura 24B).

Figura 24. Expresión de enzimas placentarias productoras de radicales libres



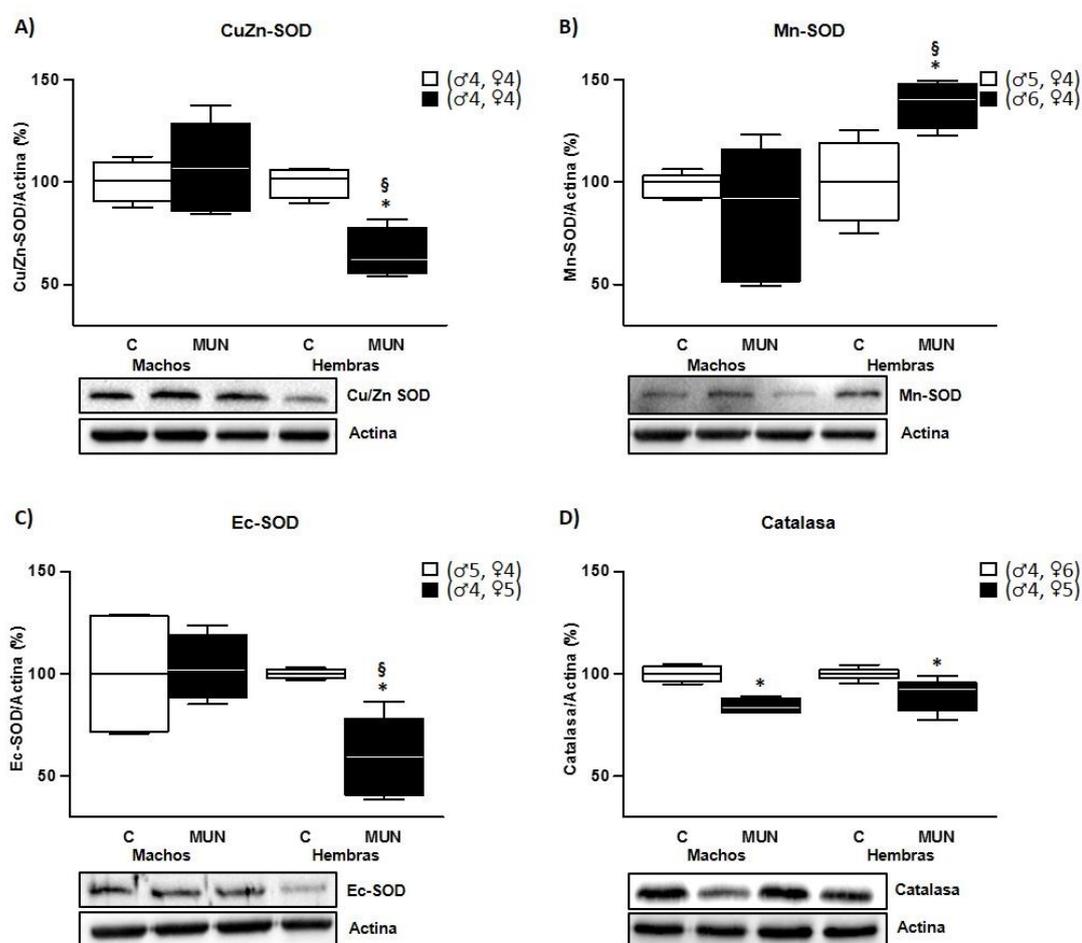
C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartílico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. § $p < 0.05$ entre sexos de cada grupo. Prueba *U de Mann-Whitney*.

2.3.3 Expresión de enzimas eliminadoras de radicales libres

Superóxido dismutasas. Se determinó la expresión de las isoformas Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Ec-SOD. Las placentas de los machos MUN no presentaron diferencias significativas con respecto a su control en la expresión de Cu/Zn-SOD, Mn-SOD ni Ec-SOD. Las placentas de hembras MUN presentaron una menor expresión de las isoformas Cu/Zn-SOD y Ec-SOD en comparación a sus controles mientras que la expresión de la isoforma Mn-SOD fue mayor que en las controles. En el grupo MUN, la expresión de Cu-SOD y Ec-SOD fue significativamente menor en las placentas de hembras que en las de machos, mientras que Mn-SOD fue significativamente mayor (Figura 25A-C).

Catalasa. La expresión de catalasa fue significativamente menor en las placentas de ambos sexos del grupo MUN, respecto al grupo C (Figura 25D).

Figura 25. Expresión de enzimas placentarias eliminadoras de radicales libres

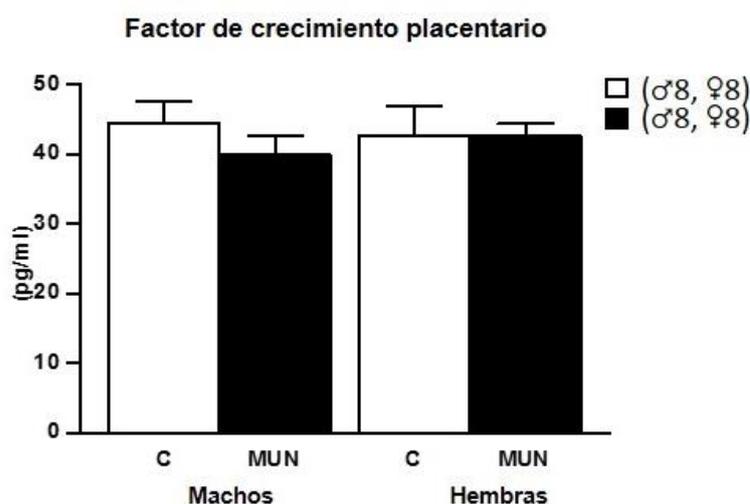


C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartílico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. § $p < 0.05$; entre sexos de cada grupo. Prueba *U de Mann-Whitney*.

2.4 Factor de crecimiento placentario

Las placentas, tanto macho como hembras, del grupo MUN presentaron niveles de factor de crecimiento placentario (PGF) similares a los encontrados en las correspondientes del grupo control (Figura 26).

Figura 26. Factor de crecimiento placentario



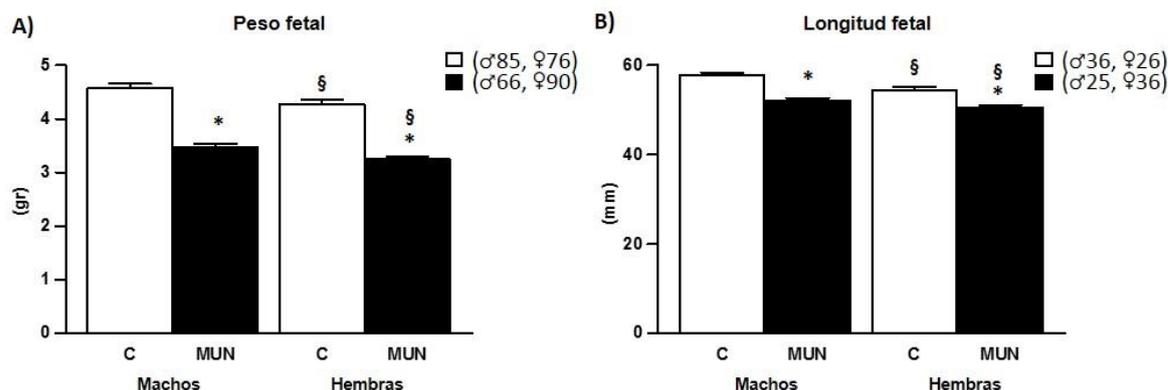
C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la media \pm error típico. Prueba *T de Student*.

3. Parámetros fetales

3.1 Peso y longitud

Peso. Los fetos de madres sometidas a restricción nutricional, tanto machos como hembras, tuvieron un peso significativamente menor (hasta un 20% menor) que los del mismo sexo de madres control. En ambos grupos las hembras tuvieron un peso significativamente menor que los machos (Figura 27A). Los machos MUN tuvieron un peso 20% menor que los machos C, mientras que las hembras MUN tuvieron un peso 21% menor que las C.

Longitud. La longitud de los fetos, tanto machos como hembras, fue significativamente menor en el grupo MUN respecto al grupo C. En ambos grupos las hembras tuvieron una longitud significativamente menor que los machos (Figura 27B).

Figura 27. Peso y longitud fetal

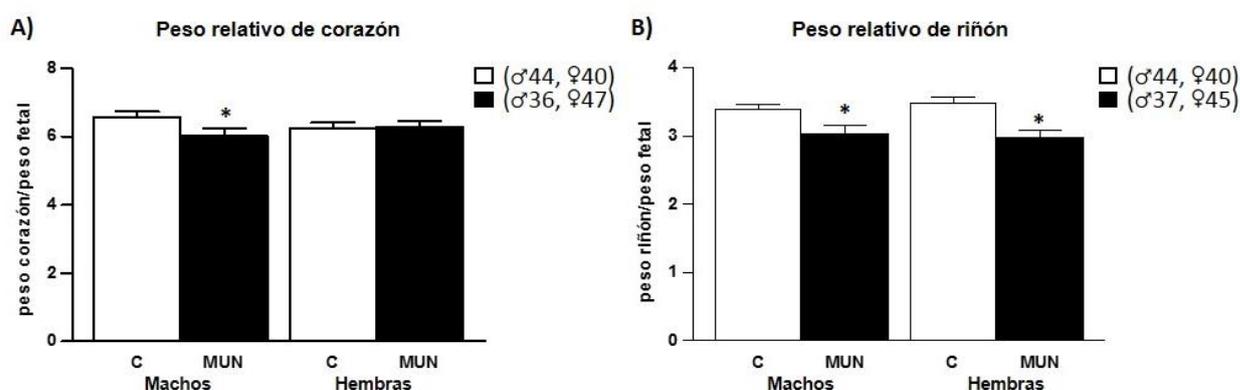
C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. § $p < 0.05$ entre sexos de cada grupo. Prueba *T de Student*.

LCPUFA y peso fetal. Tanto en los fetos del grupo C como en los del grupo MUN no se encontró correlación entre el peso de los fetos y su contenido en LCPUFA (datos no mostrados).

3.2 Pesos de órganos

Corazón. El peso relativo del corazón (peso corazón/peso fetal) fue significativamente menor en los machos MUN que en sus controles. No se encontraron diferencias significativas en el peso relativo del corazón de las hembras MUN respecto a las hembras control (Figura 28A).

Riñón. El peso relativo del riñón (peso riñón/peso fetal) fue significativamente menor en los fetos, tanto macho como hembra del grupo MUN comparados con los respectivos controles. (Figura 28B).

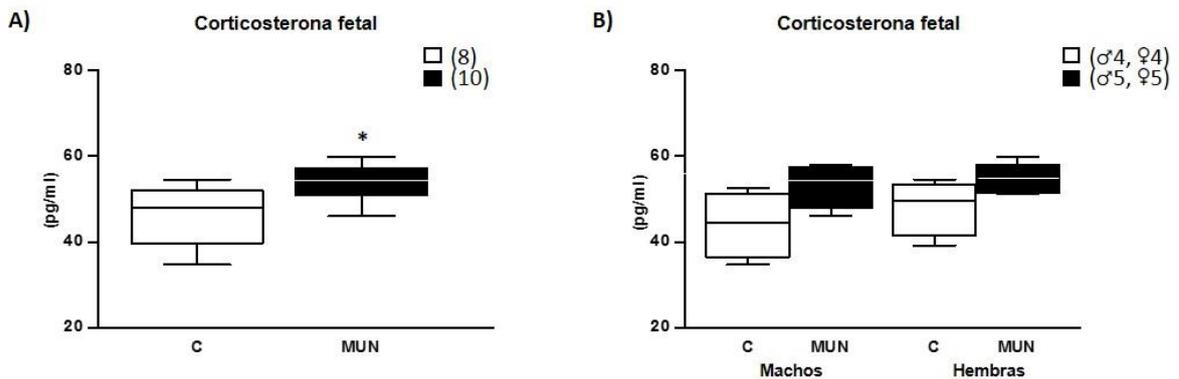
Figura 28. Pesos de órganos fetales

C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. Prueba *T de Student*.

3.3 Corticosterona plasmática

Los niveles de corticosterona en el plasma de los fetos fueron significativamente mayores en los fetos del grupo MUN que los controles (Figura 29A). Al analizar los niveles por sexos, tanto machos como hembras MUN presentaban niveles más altos que los respectivos controles, sin alcanzar significancia estadística (Figura 29B).

Figura 29. Niveles plasmáticos de corticosterona



C, ratas control; MUN, ratas sometidas a restricción nutricional. A) Entre grupos C y MUN, B) En función del grupo y sexo. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartílico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$. Prueba *U de Mann-Whitney*.

II. SUPLEMENTACIÓN CON ARA+DHA DURANTE LA GESTACIÓN

1. Parámetros de las ratas gestantes

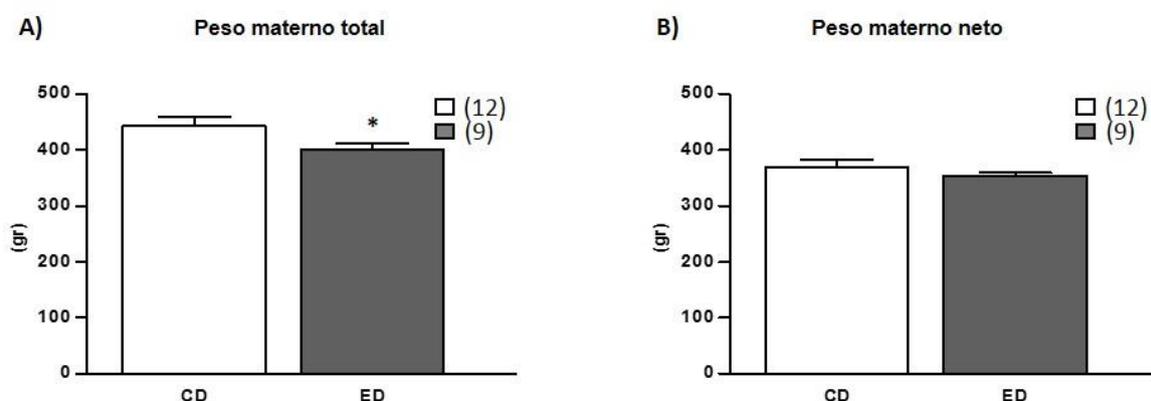
1.1 Ingesta

No se encontraron diferencias significativas en la cantidad diaria de pienso que ingerían las ratas alimentadas con dieta control (CD) y las ratas alimentadas con dieta experimental (ED) (CD=19.02±2.81 g/día, n=6; ED=18.96±2.99 g/día, n=6; p=0.36).

1.2 Peso

Al inicio de la gestación no hubo diferencias significativas en el peso de ambos grupos. En el día 20 de la gestación, el peso corporal de las ratas alimentadas con ED fue significativamente menor respecto al peso de las ratas alimentadas con CD (Figura 30A). Al analizar los pesos de las ratas sin fetos ni placenta, no se encontró diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 30B).

Figura 30. Peso materno

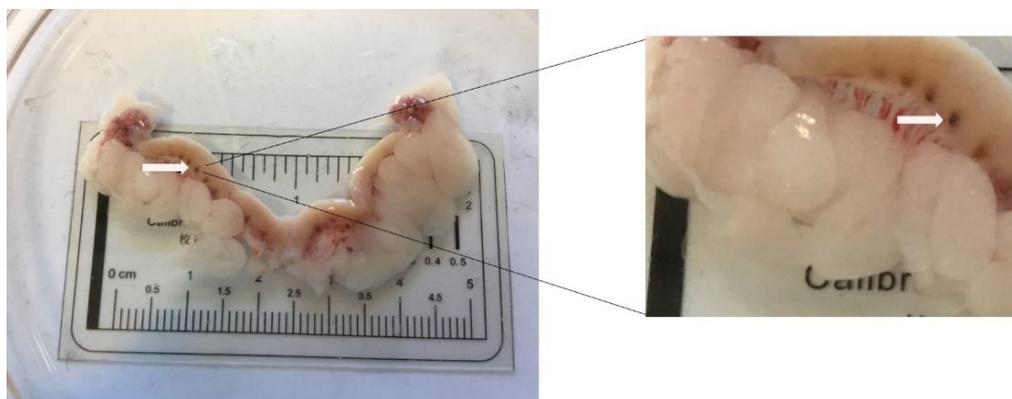


CD, dieta control; ED, dieta experimental. Los datos representan la media ± error típico. Entre paréntesis, número de animales. *p<0.05. Prueba *T de Student*.

La media del número de crías por camada en las ratas CD fue de 15 (rango 11-17). En el grupo ED observamos tres patrones diferentes: 4 de las madres tuvieron camadas de tamaño normal (rango 13-19) y peso normal (NG, crecimiento normal), 5 madres tuvieron camadas de menor tamaño (rango 3-11) y menor peso (IUGR) y 3 de las madres no tuvieron crías (FR, reabsorción

fetal). En este último caso, la existencia de reabsorción fetal fue evidenciada en los cuernos uterinos (Figura 31).

Figura 31. Reabsorción fetal en cuernos uterinos de rata alimentada con ED

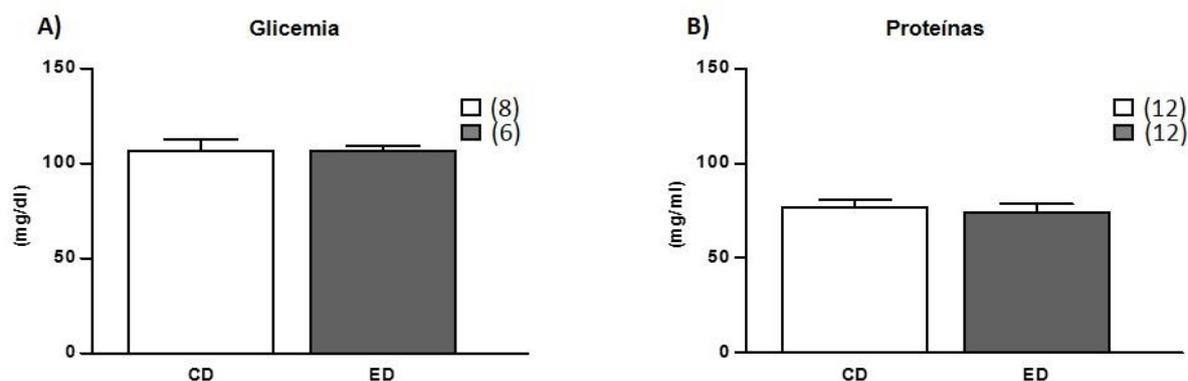


Cuernos uterinos de rata alimentada con la dieta experimental, a día 20 de gestación. Se señala la reabsorción fetal con las flechas.

1.3 Macronutrientes en plasma

Glucemia y Proteínas. No se encontraron diferencias significativas en los valores de glucemia ni en las proteínas plasmáticas maternas, entre los grupos CD y ED (Figura 32).

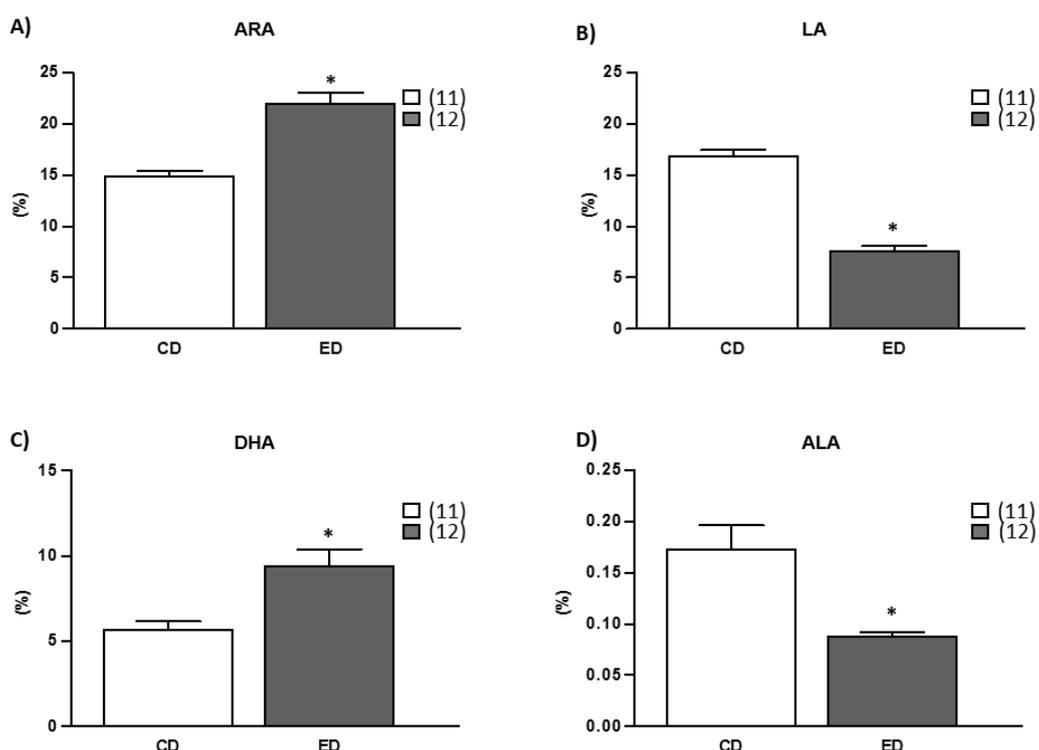
Figura 32. Glucemia y proteínas plasmáticas maternas



CD, dieta control; ED, dieta experimental. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. Prueba *T de Student*.

Ácidos grasos de cadena larga. En el grupo ED, los niveles plasmáticos de ARA y DHA fueron significativamente mayores que en el grupo CD, mientras que los niveles de sus precursores, el ácido linoléico y el ácido α -linolénico respectivamente, fueron significativamente menores en ED que en CD (Figura 33).

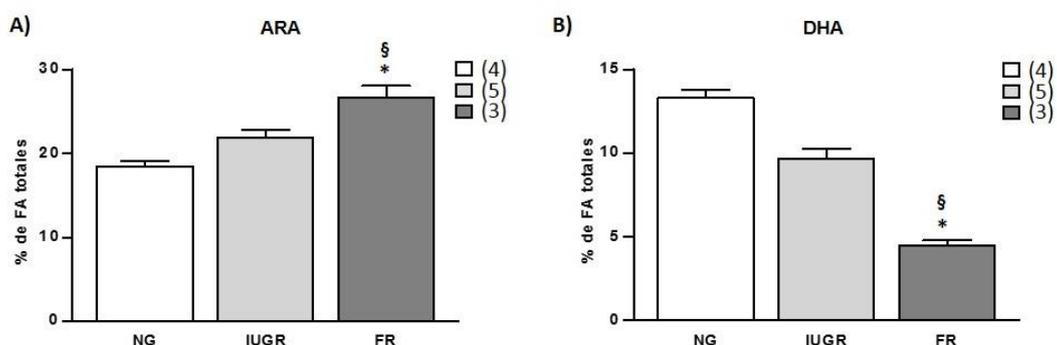
Figura 33. Niveles de LCPUFA en plasma materno



CD, dieta control; ED, dieta experimental; FA ácidos grasos; ARA, ácido araquidónico; LA, ácido linoleico; DHA, ácido docosahexaenoico; ALA, ácido α -linolénico. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$. Prueba *T de Student*.

En las madres ED observamos que, aquellas que tuvieron una camada de crecimiento normal (NG) presentaron los valores más bajos de ARA y más altos de DHA, mientras que las madres con reabsorción fetal tuvieron los valores más altos de ARA y más bajos de DHA. Los valores intermedios de ARA y DHA correspondieron a las madres con camadas IUGR (Figura 34).

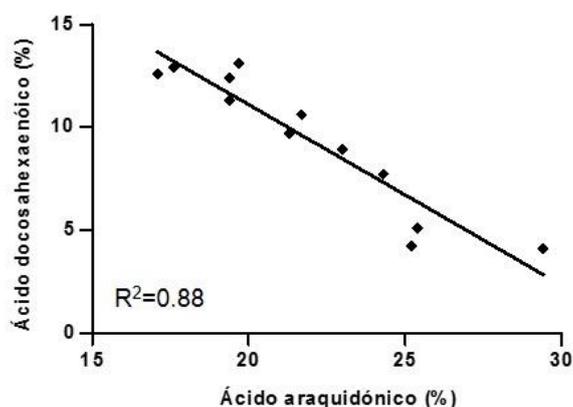
Figura 34. ARA y DHA en plasma de madres ED



NG, camada con crecimiento normal; IUGR camada con restricción del crecimiento; FR madres con reabsorción fetal; FA, ácidos grasos, ARA, ácido araquidónico; DHA, ácido docosahexaenoico. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$, vs NG; § $p < 0.05$ vs IUGR. ANOVA.

En las ratas ED se observó una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de ARA y de DHA (Figura 35). En el grupo CD no se observó correlación entre los niveles de ambos ácidos grasos.

Figura 35. Asociación entre ARA y DHA en plasma de madres ED

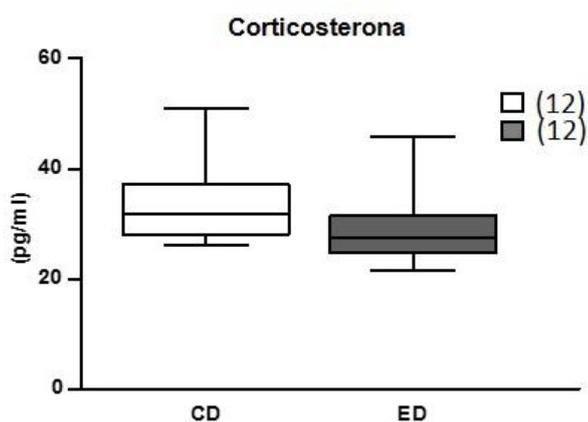


Correlación entre ARA y DHA en plasma de ratas alimentadas con la dieta experimental. $p < 0.05$.

1.4 Corticosterona plasmática

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de corticosterona plasmática entre los grupos ED y CD (Figura 36).

Figura 36. Niveles plasmáticos de corticosterona



CD, dieta control; ED, dieta experimental. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartílico. Entre paréntesis, número de animales. Prueba *U de Mann-Whitney*.

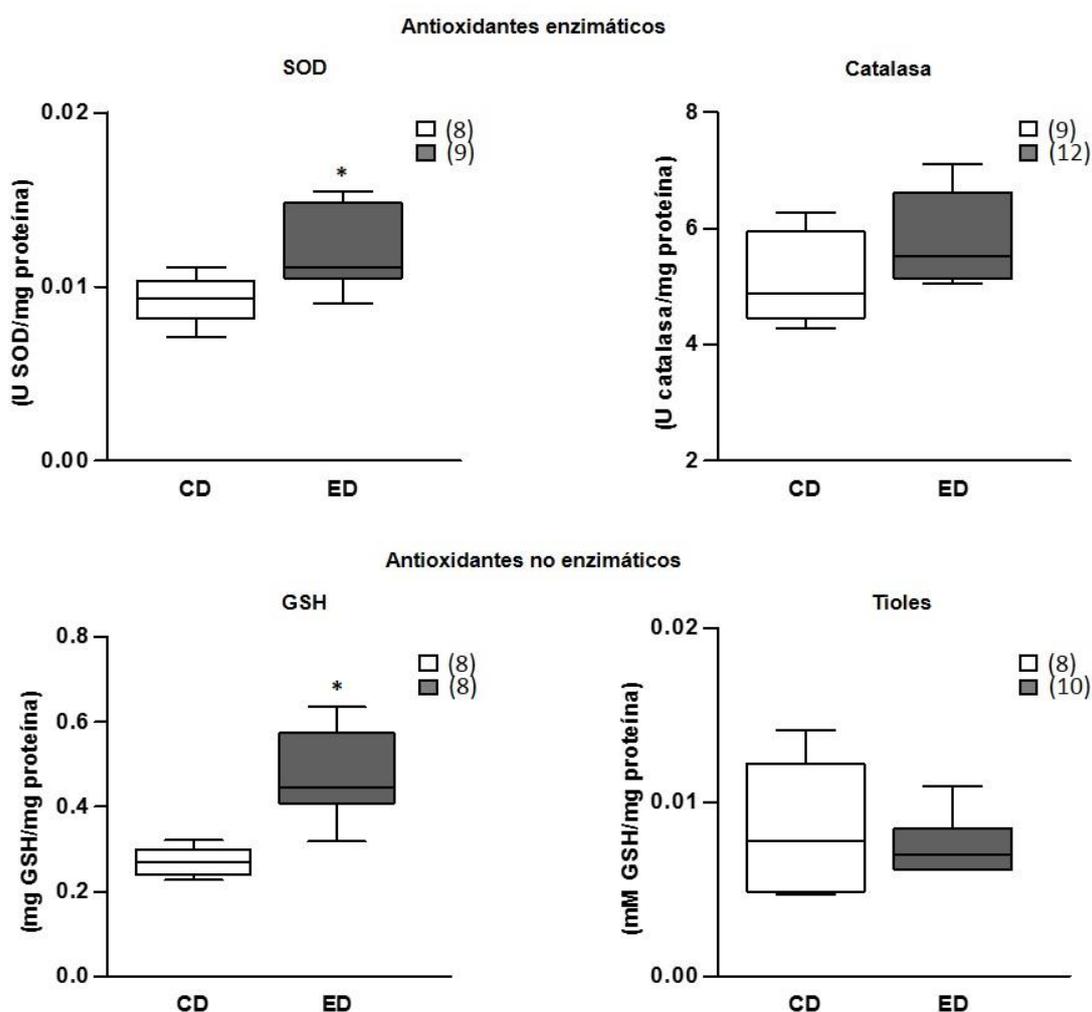
1.5 Biomarcadores plasmáticos de estrés oxidativo

1.5.1 Antioxidantes

Antioxidantes enzimáticos. La actividad superóxido dismutasa (SOD) fue significativamente mayor en el grupo ED respecto a CD (Figura 37A). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la actividad catalasa entre los grupos ED y CD (Figura 37B).

Antioxidantes no enzimáticos. El plasma de las ratas alimentadas con ED mostró niveles significativamente mayores de glutatión reducido (GSH) respecto al grupo CD (Figura 37C). No se detectaron diferencias significativas en los grupos tioles entre las ratas ED y las CD (Figura 37D).

Figura 37. Niveles plasmáticos de antioxidantes



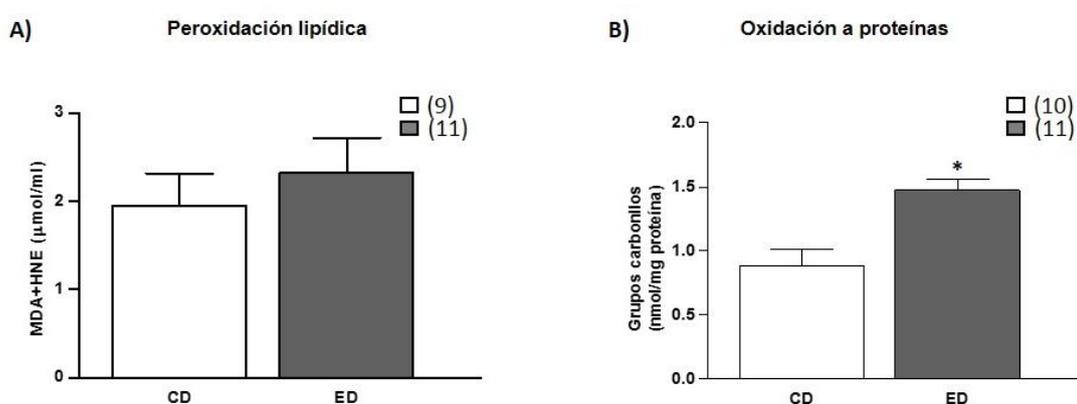
CD, dieta control; ED, dieta experimental; SOD, Superóxido dismutasa; GSH, Glutatión reducido. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartílico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$; prueba *U de Mann-Whitney*.

1.5.2 Daño oxidativo

Daño oxidativo a lípidos. No se encontraron diferencias significativas en los niveles de malondialdehído (MDA) y de 4-hidroxinonenal (HNE) entre los grupos ED y CD (Figura 38A).

Daño oxidativo a proteínas. El grupo ED presentó niveles plasmáticos de proteínas carboniladas significativamente mayores que el grupo CD (Figura 38B).

Figura 38. Niveles plasmáticos de daño oxidativo



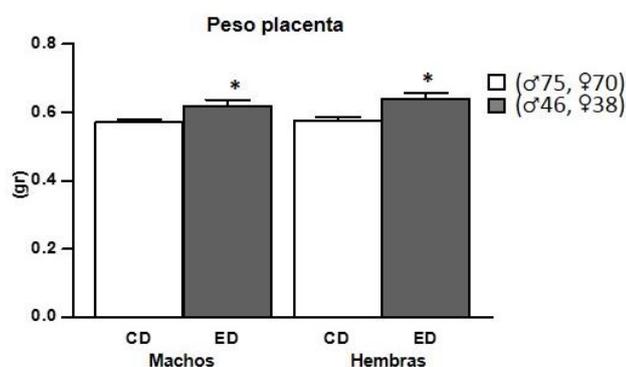
CD, dieta control; ED, dieta experimental. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$. Prueba *T de Student*.

2. Parámetros placentarios

2.1 Peso

El peso de la placenta, tanto machos como hembras, del grupo ED fue significativamente mayor que el de las del grupo control (Figura 39).

Figura 39. Peso de la placenta en función de la dieta

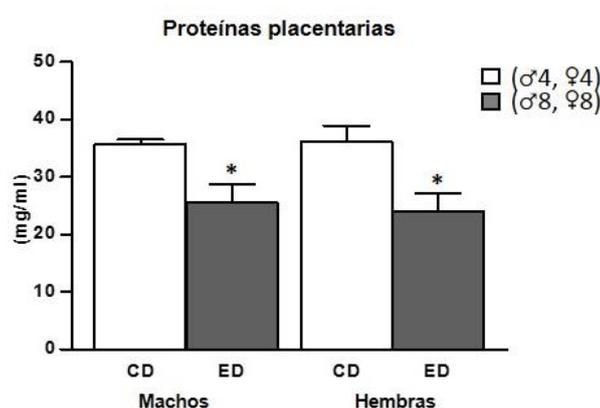


CD, dieta control; ED, dieta experimental. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. Prueba *T de Student*.

2.2 Macronutrientes en la placenta

Proteínas. Los niveles de proteínas en la placenta, tanto machos como hembras, de las ratas del grupo ED, fueron significativamente menores que en las placentas de su respectivo sexo del grupo CD (Figura 40).

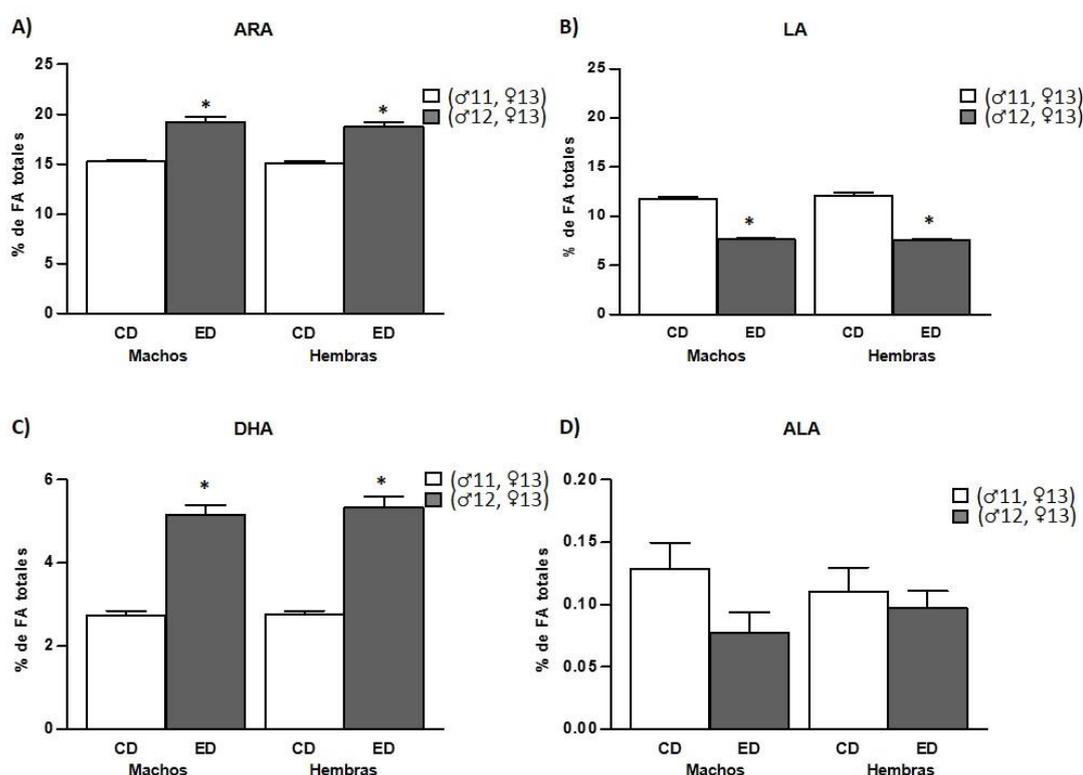
Figura 40. Proteínas placentarias



CD, dieta control; ED, dieta experimental. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. Prueba *T de Student*.

Ácidos grasos de cadena larga. Los niveles de ARA y DHA fueron significativamente mayores en placentas de machos y hembras del grupo ED respecto a las del grupo CD, mientras que los niveles de LA en machos y hembras ED fueron significativamente menores que en las CD, no encontrándose diferencias significativas entre ambos grupos en los niveles de ALA (Figura 41).

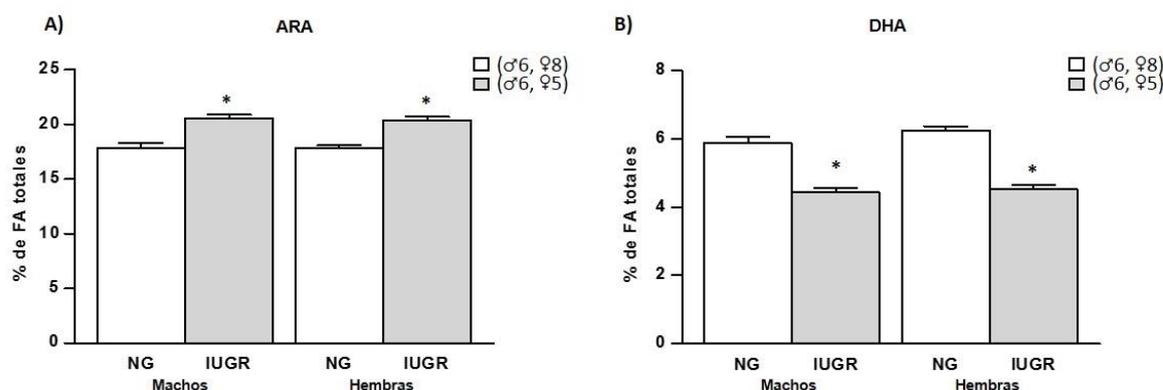
Figura 41. Niveles de LCPUFA en la placenta



CD, dieta control; ED, dieta experimental; FA ácidos grasos; ARA, ácido araquidónico; LA, ácido linoleico; DHA, ácido docosahexaenoico; ALA, ácido α -linolénico. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. Prueba *T de Student*.

Considerando los patrones de crecimiento fetal en las madres ED observamos que, las placentas de fetos IUGR tuvieron niveles significativamente más altos de ARA y niveles significativos menores de DHA respecto a las placentas NG (Figura 42).

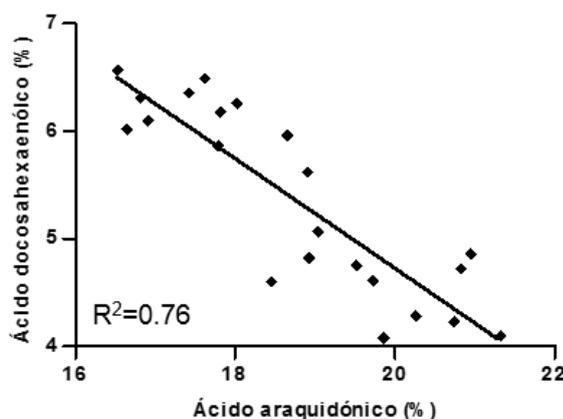
Figura 42. ARA y DHA en placentas del grupo ED



NG, camada con crecimiento normal; IUGR camada con restricción del crecimiento; FA, ácidos grasos. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$. Prueba *T de Student*.

Se encontró una correlación negativa entre los niveles de ARA y DHA en las placentas del grupo ED (Figura 43). No se observó correlación entre estos parámetros en las placentas del grupo CD.

Figura 43. Asociación entre ARA y DHA en placenta de ratas ED



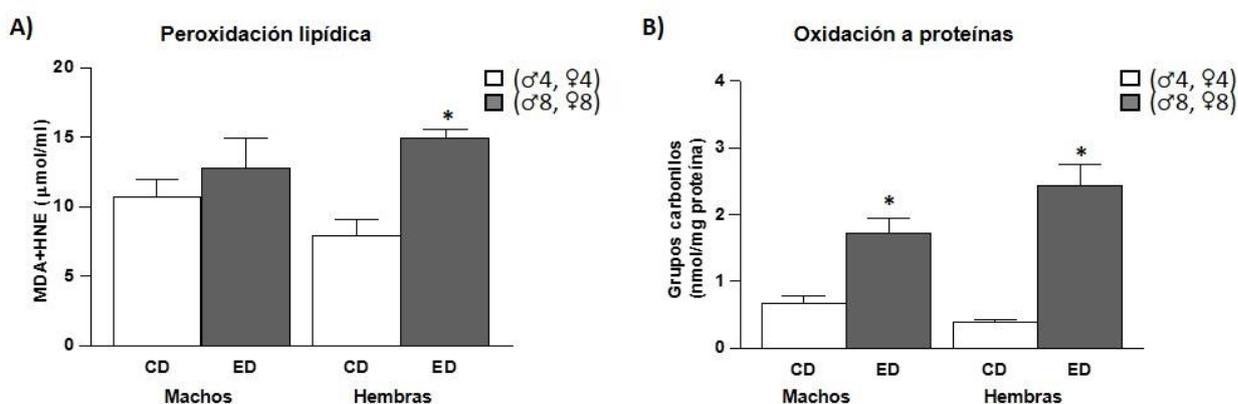
Correlación entre el ácido araquidónico (ARA) y el ácido docosahexaenóico (DHA). $p < 0.05$.

2.3 Biomarcadores de estrés oxidativo en la placenta

Daño oxidativo a lípidos. Los niveles de malondialdehído (MDA) y 4-hidroxinonenal (HNE) en las placentas hembras ED, pero no en las placentas macho, fueron significativamente mayores en comparación con las CD de su respectivo sexo (Figura 44A).

Daño oxidativo a proteínas. El nivel de proteínas carboniladas en la placenta del grupo ED, tanto machos como hembras, fue significativamente mayor que en las del respectivo sexo del grupo CD (Figura 44B).

Figura 44. Daño oxidativo en placenta



CD, dieta control; ED, dieta experimental. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. Prueba *T de Student*.

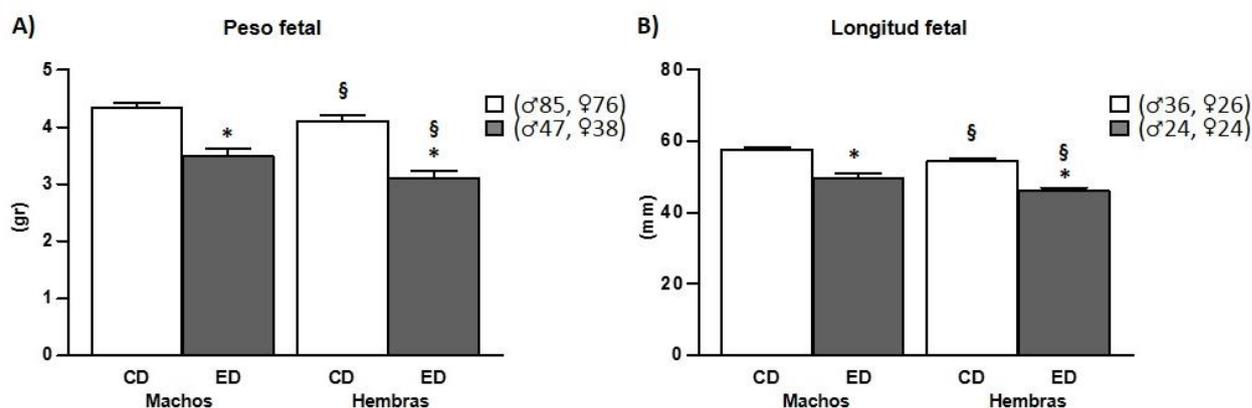
3. Parámetros fetales

3.1 Peso y longitud

Peso. Los fetos ED, tanto machos como hembras, tuvieron un peso significativamente menor que los fetos CD. Los machos ED tuvieron un peso 19% menor que los machos CD, mientras que las hembras ED tuvieron un peso 24% menor que las CD. Al comparar entre sexos dentro de cada grupo se encontró que los fetos hembra, tanto CD como ED, presentaron un peso menor que los fetos macho de sus respectivos grupos (Figura 45A).

Longitud. La longitud de los fetos del grupo ED fue significativamente menor comparado con los del grupo CD, tanto en machos como en hembras. Al comparar entre sexos dentro de cada grupo se encontró que los fetos hembra, tanto CD como ED, presentaron una longitud menor que los fetos macho de sus respectivos grupos (45B).

Figura 45. Peso y longitud fetal

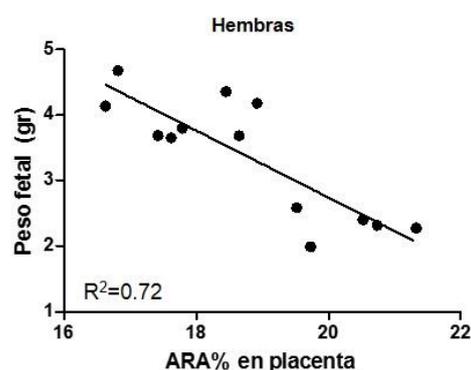
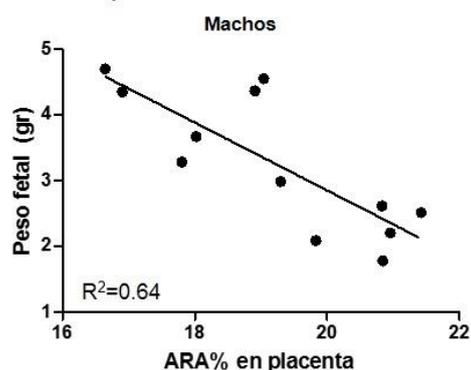


CD, dieta control; ED, dieta experimental. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. § $p < 0.05$ entre sexos de cada grupo. Prueba *T de Student*.

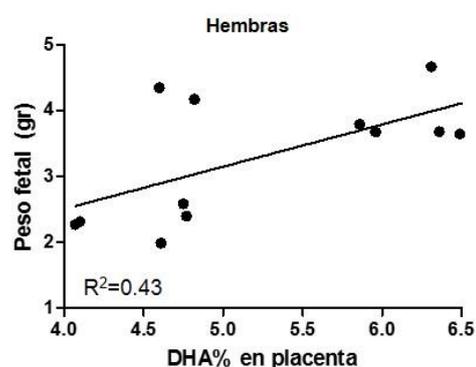
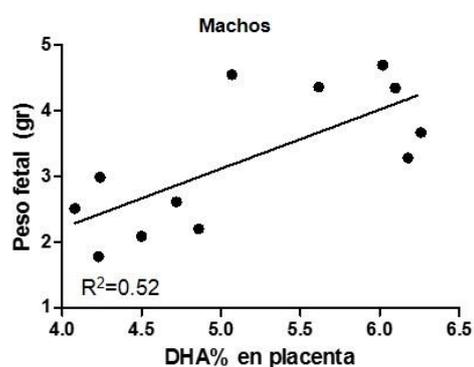
LCPUFA y peso fetal. En el grupo ED se encontró una correlación negativa entre el peso fetal y los niveles de ARA en la placenta, tanto en machos como en hembras (Figura 46A). En ambos sexos se encontró una correlación positiva entre el peso fetal y los niveles de DHA de la placenta (Figura 46B). Estas correlaciones no se observaron en el grupo CD.

Figura 46. LCPUFA en placenta y peso fetal

A) Ácido araquidónico



B) Ácido docosahexaenóico



Correlación entre A) Peso fetal y ácido araquidónico (ARA) placentario y B) Peso fetal y ácido docosahexaenóico (DHA) placentario. $p < 0.05$.

Además, utilizando un modelo de regresión lineal, en el grupo ED se observó que los niveles de ARA y de DHA en la placenta explican el 56.7% del peso fetal en machos y el 71.7% del peso fetal en hembras.

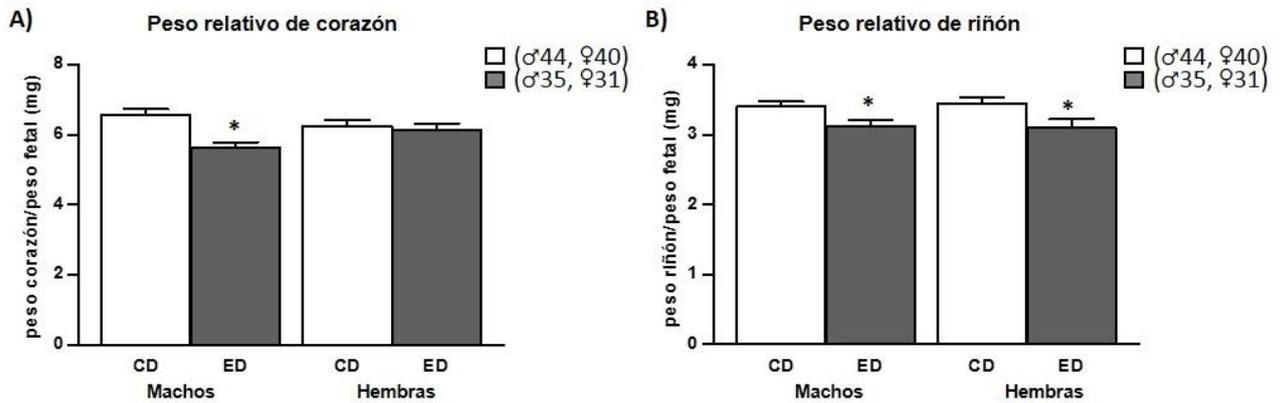
Por otro lado, en el grupo ED también se observa una correlación negativa entre la peroxidación lipídica y el peso fetal en hembras ($r = -0.69$, $r^2 = 0.47$, $p = 0.05$), pero no en machos. En el grupo C no se observó esta correlación.

3.2 Peso de órganos

Corazón. El peso relativo del corazón (peso corazón/peso fetal) fue significativamente menor en los machos del grupo ED respecto a los machos del grupo CD. El peso relativo del corazón de las hembras ED no mostraron diferencias significativas respecto al de las hembras CD (Figura 47A).

Riñón. El peso relativo del riñón (peso riñón/peso fetal) en ambos sexos del grupo ED fue significativamente menor comparados con sus respectivos controles (Figura 47B).

Figura 47. Peso de órganos fetales

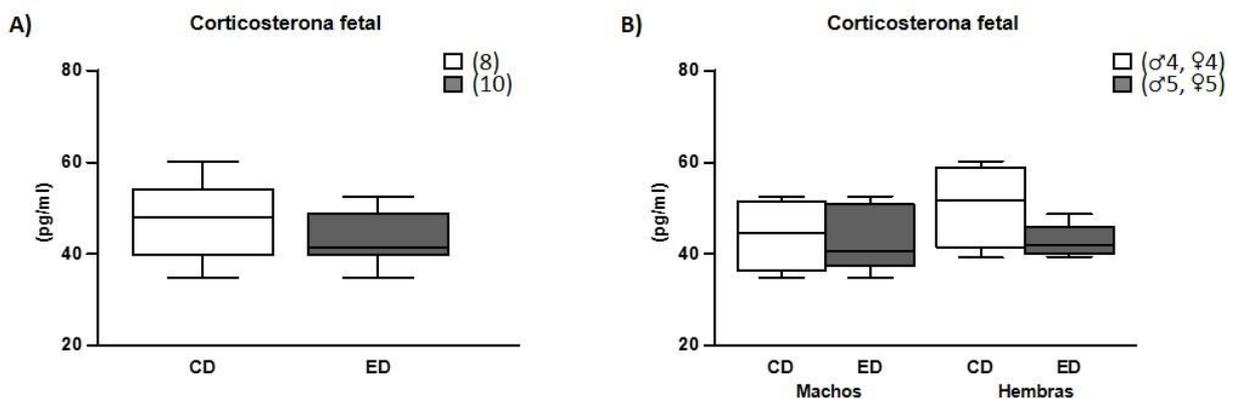


CD, dieta control; ED, dieta experimental. Los datos representan la media \pm error típico. Entre paréntesis, número de animales. * $p < 0.05$ respecto al control del mismo sexo. Prueba *T de Student*.

3.3 Corticosterona plasmática

No se encontraron diferencias significativas en los niveles de corticosterona plasmática fetal entre los grupos ED y CD (Figura 48).

Figura 48. Niveles plasmáticos de corticosterona fetal



CD, dieta control; ED, dieta experimental. A) Entre grupos, B) En función del grupo y sexo. Los datos representan la mediana \pm rango intercuartílico. Entre paréntesis, número de animales. Prueba *U de Mann-Whitney*.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. Efecto de la desnutrición materna durante la gestación

En el presente estudio, se ha utilizado un modelo de programación fetal en rata, causado por desnutrición de la madre durante la gestación, en el que ha sido demostrado que los descendientes tienen bajo peso al nacer. Además, estudios previos en este modelo experimental, han puesto de manifiesto que el desarrollo de alteraciones cardiovasculares es dependiente del sexo, presentando HTA en la edad adulta solo en los machos.

En este estudio se han evaluado las alteraciones producidas por la desnutrición en la madre y en el feto, así como el papel de la placenta en la programación fetal.

Con el objetivo de facilitar la discusión, al inicio de cada apartado se incluye un esquema que resume los resultados relacionados más relevantes.

Efectos de la desnutrición en la madre

Figura 49. Cambios maternos en ratas sometidas a restricción nutricional



LCPUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

Uno de los objetivos de este trabajo fue evaluar cómo la desnutrición afecta al metabolismo materno y al desarrollo de la gestación.

Una restricción nutricional global del 50% durante la segunda mitad de la gestación (G11-G20) en la madre produce una menor ganancia de peso, de forma similar a lo encontrado en otros estudios donde se utiliza un modelo

similar al nuestro (Lesage, 2002) y en estudios anteriores en este mismo modelo experimental (Muñoz-Valverde et al., 2015). Este efecto se debe, no solo a un menor crecimiento fetal, sino también a una menor ganancia de peso de la madre, como demuestra el hecho de que su peso corporal sin fetos ni placenta sea más bajo que el de las ratas control. Estos datos sugieren una alteración en el metabolismo de la madre.

Es conocido que durante la gestación se producen importantes cambios metabólicos. Las primeras etapas de la gestación están relacionadas con un estado anabólico con un aumento en los depósitos de grasa materna y pequeños aumentos en la sensibilidad a la insulina. Esto permite que los nutrientes se almacenen en estas etapas tempranas del embarazo para satisfacer las demandas materno-placentarias de etapas posteriores de la gestación y la lactancia. En contraste, las etapas tardías de la gestación, se caracterizan por un estado catabólico con sensibilidad reducida a la insulina (aumento de la resistencia a la insulina), lo que da como resultado aumentos en la concentración materna de glucosa y ácidos grasos libres, permitiendo una mayor disponibilidad de sustratos para el feto (Lain and Catalano, 2007). El feto en desarrollo utiliza la glucosa como el principal sustrato. Como el feto en condiciones normales no produce glucosa de manera endógena (DiGiacomo, 1989), la glucosa materna debe cruzar la placenta para así estar disponible para el feto. En nuestras condiciones experimentales no parece que el feto presente una deficiencia de este sustrato energético ya que las ratas sometidas a desnutrición no presentaron disminución en la glucemia. Resultados similares se han encontrado en un modelo con dieta baja en proteínas durante toda la gestación (Vega et al., 2016), pero difieren de los encontrados por Lesage, en los que al final de la gestación se observó una hipoglucemia materna (Lesage, 2002). Estas diferencias se pueden atribuir a que en este último estudio se utilizó la cepa Wistar que puede presentar una respuesta metabólica diferente ante la restricción de nutrientes.

Aunque durante períodos cortos de inanición, el hígado libera glucosa principalmente a través de la glucogenólisis, períodos prolongados de desnutrición, agotan el glucógeno y los hepatocitos sintetizan glucosa a través de la gluconeogénesis (Rui, 2014). Nuestros resultados sugieren que el

mantenimiento de glucemia en la madre desnutrida probablemente se produce por esta vía. En nuestras condiciones experimentales los aminoácidos procedentes del catabolismo de proteínas pueden ser los sustratos para la gluconeogénesis, ya que observamos una disminución de las mismas en el plasma materno de las ratas MUN. La utilización de aminoácidos en rutas gluconeogénicas reduciría su disponibilidad para el feto comprometiendo su crecimiento. El incremento del catabolismo observado en las ratas gestantes sometidas a desnutrición podría estar relacionado con los niveles elevados de corticosterona ya que, ésta es una hormona catabólica que se libera como respuesta al estrés (Christiansen et al., 2007), siendo una de sus funciones principales el aumento de la glucemia a través de la gluconeogénesis. En nuestro estudio, los niveles de corticosterona materna están incrementados con respecto a la gestación en condiciones óptimas de alimentación, probablemente por el estrés que genera la deficiencia de nutrientes. Niveles elevados de corticosterona también han sido descritos en otros modelos experimentales de desnutrición global materna o en la privación selectiva de proteínas durante la gestación (Langley-Evans, et al., 1996; Lesage et al., 2001).

Durante el embarazo, además de mayores niveles de proteínas, los tejidos maternos, fetales y la placenta requieren niveles más altos de LCPUFA y el desarrollo del feto depende principalmente del suministro materno de estos ácidos grasos (Smits et al., 2013). En el último trimestre, los requerimientos fetales de ARA y DHA son especialmente altos debido a la rápida síntesis de tejido cerebral (Wadhvani et al., 2017). Diversos estudios en humanos, han demostrado que en patologías como la preeclampsia y el IUGR los niveles de ARA y DHA se encuentran disminuidos (Kulkarni et al., 2011; Wadhvani et al., 2017). Aunque en nuestro estudio, los niveles de LCPUFA en el plasma materno de ratas MUN no se encontraron alterados, sí aparecieron disminuidos en la placenta lo que sugiere que hay una deficiencia de los mismos para el crecimiento fetal.

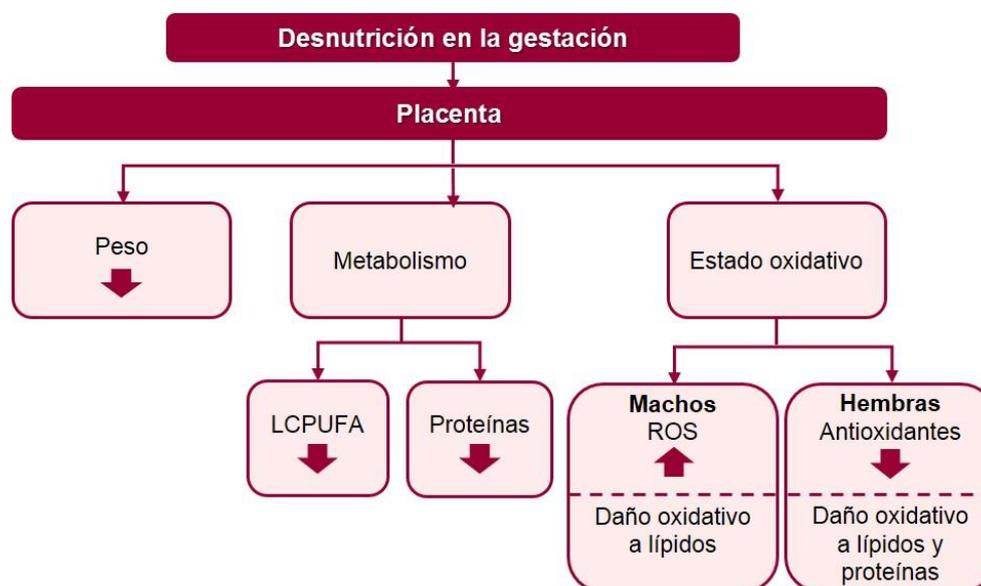
Por otro lado, durante el embarazo se incrementa la demanda de oxígeno y, como consecuencia, aumenta la producción de ROS por la placenta, éstos son necesarios para diversas funciones. Sin embargo, un exceso de ROS podría

comprometer la función de la placenta y por tanto, el desarrollo fetal. De hecho, alteraciones obstétricas que conllevan estrés oxidativo, como la PE o el IUGR, se asocian a un bajo peso al nacer (Moore and Davies, 2005; Duhig et al., 2016). En este estudio no se ha evaluado la producción de ROS, ya que son difíciles de medir de forma fiable, al ser moléculas de vida media muy corta (Griendling et al., 2016). Sin embargo, es plausible que las ratas MUN presenten una elevación de ROS por encima de los niveles fisiológicos relacionada con los elevados niveles de corticosterona y el aumento del catabolismo. El hecho de que a G20 las ratas sometidas a desnutrición no presenten daño oxidativo plasmático, pero sí unos niveles elevados de algunos antioxidantes puede ser atribuido a una respuesta compensatoria de la madre ante un exceso de ROS. Este tipo de respuesta compensatoria ha sido previamente descrita en otras situaciones que aumentan los niveles de ROS como el ejercicio físico (Halliwell, 2013). Nuestros resultados difieren de los encontrados en un modelo experimental de restricción de proteínas en el que se encontró daño oxidativo en plasma materno, asociado con una deficiencia de antioxidantes (Vega et al., 2016). Estas diferencias pueden ser atribuidas a la mayor severidad del modelo de desnutrición proteica y al hecho de que la madre no sea capaz de compensar la elevación de ROS mediante el incremento de antioxidantes.

La restricción nutricional durante la gestación induce una menor ganancia de peso materno, relacionada con un incremento en los niveles de corticosterona y en el catabolismo proteico. Este reajuste en el metabolismo permite mantener la glucemia posiblemente mediante gluconeogénesis a partir de aminoácidos. El aumento de antioxidantes en el plasma materno puede ser un mecanismo compensatorio ante una elevación de ROS asociada al incremento del catabolismo.

Alteraciones en la placenta inducidas por la desnutrición materna

Figura 50. Cambios en la placenta en el grupo MUN



LCPUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; ROS, especies reactivas de oxígeno.

La placenta es un órgano multifuncional altamente eficiente que integra señales tanto de la madre como del feto para satisfacer la demanda fetal de nutrientes, al tiempo que garantiza que los productos de desecho fetales pasen a la madre para su eliminación. Una situación de estrés durante la etapa gestacional (desnutrición, hipoxia, exposición a tóxicos, etc.) se traduce en cambios en la placenta, incluyendo alteraciones en su peso, morfología, desarrollo vascular y en los transportadores de nutrientes.

El efecto de la restricción nutricional sobre el peso de la placenta está demostrado; sin embargo, la duración, la etiología y la etapa gestacional de la restricción nutricional pueden afectar de manera diferente a la placenta, pudiendo en ocasiones resultar en una respuesta adaptativa que permita un adecuado aporte de nutrientes y oxígeno al feto o contribuir a la programación fetal (Myatt, 2006). En nuestras condiciones experimentales, en las que la restricción de nutrientes se produjo durante la segunda mitad de la gestación, la consecuencia fue un menor desarrollo de la placenta, como demuestra el hecho de su menor peso y de su deficiencia en proteínas y ácidos grasos esenciales. Una reducción en el peso de la placenta al final de la gestación también ha sido descrita en otros estudios de restricción nutricional en rata

(Belckaemi et al., 2009; Belckacemi et al., 2011) y en ovejas (Osgerby et al., 2004). También son similares las alteraciones en la placenta humana en respuesta a desnutrición. Así, se ha descrito que las mujeres sometidas a la inanición en el tercer trimestre del embarazo tuvieron placentas pequeñas y sus descendientes tuvieron bajo peso al nacer. En contraste, las mujeres expuestas a la hambruna solo durante el primer trimestre del embarazo y que posteriormente mantuvieron una alimentación adecuada, el peso de la placenta y el peso del recién nacido no presentaron diferencias en comparación con mujeres que no habían estado sometidas a desnutrición (Lumey, 1998). Estos resultados sugieren que, ante una deficiencia al inicio de la gestación, la placenta humana se adapta incrementando su tamaño permitiendo que la nutrición fetal no se vea afectada (Lumey, 1998; Eriksson et al., 2010). Esta adaptación de la placenta en etapas tempranas de la gestación también se ha demostrado en otras especies como la ovina (McCrabb, 1992).

La placenta tiene el mismo sexo del individuo (Kalisch-Smith et al., 2017) y se ha demostrado que las placentas masculinas y femeninas presentan importantes diferencias morfológicas y fisiológicas (Rosenfeld, 2015). Por ejemplo, se ha observado que existen diferencias en la cantidad de proteínas transportadoras de glucocorticoides, la expresión de hormonas y la producción de proteínas relacionadas con el sistema inmune (Gabory et al., 2013; Tarrade et al., 2015). Además, en humanos la placenta de varones y mujeres presenta importantes diferencias en la respuesta al estrés (Januar et al., 2015). Así, se ha observado que la placenta de varones está peor adaptada a condiciones de desnutrición que la de hembras, sobre todo si la deficiencia de nutrientes se produce desde etapas tempranas y se mantiene a lo largo de toda la gestación (Eriksson et al., 2010). Es conocido que la placenta masculina tiene un mayor crecimiento relacionado a la presencia de testosterona desde la etapa fetal. En situaciones en las que la desnutrición se mantiene a lo largo del embarazo, la placenta masculina, por ser más grande gasta más energía en su propio metabolismo en detrimento del desarrollo del feto. La desnutrición materna produjo el mismo efecto en las placentas de ambos sexos. Esta diferencia, con los resultados en humanos puede estar relacionada con el período en el cual se expuso a la desnutrición. Sin embargo, en nuestro modelo experimental, no

se observó diferencia en el tamaño de la placenta entre machos y hembras en el caso de ratas MUN, el menor peso al final de la gestación se observó por igual en ambos sexos.

Por otro lado en las placentas de ratas MUN, se observó una deficiencia tanto de proteínas como de ácidos grasos esenciales. Esta deficiencia podrá contribuir al pobre desarrollo fetal observado, ya que reflejaría un insuficiente acceso de los nutrientes. Por un lado, los aminoácidos juegan un papel crítico en el desarrollo del tejido fetal, por lo que la reducción de proteínas observada tanto en el plasma materno como en la placenta, podría hacer que el feto tuviera menor disponibilidad de aminoácidos. En IUGR, tanto en humanos como en modelos animales, se ha observado una disminución del aporte de aminoácidos ya sea por una menor área de superficie de la placenta como por una disminución en los sistemas de transporte (Regnault et al., 2005). El menor tamaño de la placenta de ratas MUN, junto con la reducción de la disponibilidad de proteínas maternas, sugiere que el transporte de aminoácidos se encuentre reducido. En este estudio no se evaluaron los transportadores de membrana, por lo que no podemos descartar que además exista una reducción de su expresión, que contribuya al pobre desarrollo observado en descendientes de las ratas sometidas a desnutrición.

Por otro lado, los ácidos grasos poliinsaturados ARA y DHA se encontraron deficientes en la placenta de ratas MUN. Este resultado, que no se ha descrito en otros modelos de desnutrición fetal, es de gran relevancia ya que estos LCPUFA forman parte de las membranas biológicas y, una deficiencia podría contribuir a un pobre desarrollo fetal. La placenta modula el suministro de ácidos grasos para su propio metabolismo y también para el feto. El hecho de que el ARA y el DHA se encuentren deficientes en la placenta pero no en el plasma materno, sugiere que la placenta los está utilizando para su propio metabolismo, lo que podría reducir su disponibilidad para el feto. Esto es consistente con el incremento en el metabolismo lipídico en la placenta en condiciones de IUGR (Herrera and Ortega-Senovilla, 2014).

Otro importante factor que puede influir en la función placentaria y, por tanto, en la nutrición y crecimiento fetal, es el desarrollo de la vasculatura de la placenta, que requiere de una adecuada vasculogénesis y angiogénesis

(Huppertz, 2012). La vasculogénesis es el desarrollo de vasos sanguíneos de *novo* a partir de células madre mesenquimales pluripotentes. La angiogénesis es la formación de nuevas redes de vasos sanguíneos al ramificar y alargar los vasos previamente existentes para hacer nuevas conexiones (Wang and Zhao, 2010). Entre los factores más importantes en la formación de los vasos placentarios está el factor de crecimiento placentario (PGF, placental growth factor), un miembro de la subfamilia VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular). La principal fuente de PGF durante el embarazo es el trofoblasto placentario y, en diversas patologías como la preeclampsia y el IUGR, el PGF está disminuido (Benton et al., 2012; Chau et al., 2017). En nuestro estudio no se encontraron alteraciones en los niveles de PGF en las placentas del grupo MUN, lo que sugiere que no se ha producido una deficiencia en el desarrollo vascular placentario; sin embargo, no podemos descartar posibles alteraciones en la expresión de sus receptores. En un modelo de programación fetal en ovejas, se ha encontrado que, aunque no existen alteraciones en la expresión del mRNA de VEGF en la placenta, la expresión del mRNA de su receptor sí está reducido (Reynolds et al., 2005).

El hecho de que la placenta sea uno de los tejidos con mayor consumo de oxígeno y por lo tanto producción de ROS (Vaughan and Fowden, 2016), la hace más susceptible al daño oxidativo. Se ha sugerido que el estrés oxidativo de la placenta puede ser el nexo de unión entre un ambiente intrauterino adverso y un inadecuado crecimiento fetal (Thompson and Al-Hasan, 2012). En nuestro estudio, las placentas del grupo MUN presentaron signos de daño oxidativo, lo que sugiere que hay un desequilibrio entre la producción y la eliminación de ROS. Estos resultados son similares a los encontrados en un modelo de programación fetal inducida por exposición a glucocorticoides (Stark et al., 2011). Puesto que en nuestro modelo experimental encontramos niveles elevados de corticosterona en la madre y que los glucocorticoides incrementan la producción de ROS, sugerimos que estos niveles elevados de corticosterona podrían contribuir al daño oxidativo encontrado en la placenta de ratas MUN.

Nuestros resultados en rata indican que la placenta femenina presenta mayores niveles de daño oxidativo en respuesta a la desnutrición. Nuestros datos indican un dimorfismo sexual en la expresión de enzimas productoras y

eliminadoras de radicales libres. En la placenta masculina, la desnutrición materna induce un incremento en la expresión de algunas enzimas productoras de ROS, mientras que, provoca una reducción en las hembras. Por otro lado, el comportamiento de enzimas antioxidantes también es diferente entre sexos, con una tendencia general a estar disminuida en hembras. Aunque en este estudio no se ha medido la actividad de estas enzimas, sugerimos que una deficiencia de antioxidantes podría explicar el mayor daño oxidativo en las placentas de hembras. En PE y DG, patologías relacionadas con estrés oxidativo y nitrosativo de la placenta, se ha descrito que la placenta de hembras presenta alteraciones bioquímicas que deprimen la respiración mitocondrial (Myatt, 2018). Una disminución de la respiración mitocondrial está relacionada con incremento en la producción de O_2^- . Si los sistemas antioxidantes mitocondriales (Mn-SOD) no son capaces de eliminar este exceso de O_2^- produciría un círculo vicioso que continúa generando O_2^- (Rodríguez-Rodríguez et al., 2017). Nuestros resultados sugieren que en la placenta de hembras podría haber una alteración de la cadena de transporte mitocondrial y que la mayor expresión de Mn-SOD podría ser un mecanismo compensatorio ante un posible aumento de ROS mitocondriales. Sin embargo, esta compensación no parece ser suficiente, ya que observamos que tanto lípidos como proteínas presentan mayores niveles de daño oxidativo en hembras.

La desnutrición materna durante la segunda mitad de la gestación interfiere con el desarrollo de la placenta, que no afecta a la angiogénesis. Además, produce daño oxidativo en la placenta que presenta un dimorfismo sexual.

Efectos de la desnutrición materna en el feto

Figura 51. Efectos fetales de la restricción nutricional materna



La restricción nutricional durante la segunda mitad de la gestación no afectó al número de fetos por camada. Estos resultados difieren de los encontrados en otros modelos experimentales, en los que la desnutrición se realizó durante toda la gestación (Ramadan et al., 2013). Esto sugiere que las intervenciones nutricionales que incluyen la primera etapa de la gestación pueden provocar una reducción en el número de fetos, probablemente debido a alteraciones en la implantación, puesto que en la rata ésta ocurre entre los días 4 y 5 de gestación (Fonseca et al., 2012).

Aunque en nuestro modelo, la desnutrición materna no afectó al tamaño de la camada, los fetos presentaron un menor crecimiento (peso y longitud) que los fetos de madres control y confirman que este modelo experimental produce IUGR (Muñoz-Valverde et al., 2015; Rodríguez-Rodríguez et al., 2015) de forma similar a lo descrito en humanos y en otros modelos animales de programación fetal por restricción calórica, restricción proteica o insuficiencia placentaria (Barker and Clark, 1997; Nüsken et al., 2008; Belkacemi et al., 2011; Ramadan et al., 2013). El menor desarrollo fetal en las ratas MUN puede estar relacionado con la deficiencia en proteínas maternas y, por tanto, la disponibilidad de aminoácidos al feto como elemento estructural. Aunque los LCPUFA no estaban alterados en el plasma materno, su menor concentración

en la placenta sugiere que pueden estar deficientes en el feto, lo que también contribuiría al peor crecimiento.

Nuestros datos indican que la desnutrición materna produce una elevación de los niveles de corticosterona en el feto de forma similar a lo encontrado en otros modelos de desnutrición (Lesage et al., 2001). Además, también se ha demostrado que la exposición a altos niveles de glucocorticoides en la etapa intrauterina reduce el peso al nacer y programa al feto para el desarrollo de HTA en la edad adulta (Seckl, 2004). En condiciones normales, el feto está protegido de un exceso de glucocorticoides por el sistema enzimático 11β HSD2, presente en la placenta, habiéndose descrito que una deficiencia en este sistema enzimático produce bajo peso al nacer (Kajantie et al., 2003). Situaciones de estrés durante la gestación, como la desnutrición (Lesage et al., 2006) o la exposición a tóxicos medioambientales (Zhang et al., 2015), pueden afectar a este sistema enzimático reduciendo su expresión y permitiendo que los fetos estén expuestos a altos niveles de glucocorticoides. Nuestros resultados sugieren que el bajo peso al nacer de los fetos MUN podría estar relacionado, no solo con la deficiencia de nutrientes en la madre, sino también con un exceso de corticosterona y una elevación del catabolismo fetal.

En la rata MUN hemos demostrado previamente que los machos desarrollan HTA en la edad adulta, mientras que las hembras se mantienen normotensas hasta el envejecimiento (Rodríguez-Rodríguez et al., 2017). En este estudio hemos evaluado posibles alteraciones en órganos relacionados con la regulación cardiovascular, con objeto de determinar si ya en la etapa fetal se produce una deficiencia en el desarrollo de estos órganos de forma sexo-dependiente.

Se ha descrito que el tamaño renal y el número de nefronas es menor en fetos de animales expuestos a condiciones adversas en la etapa intrauterina (Zimanyi et al., 2002), lo cual se ha sugerido que puede participar en el desarrollo de HTA (Zohdi et al., 2012). Nuestros datos indican una reducción del peso relativo del riñón tanto en machos como en hembras, lo que indica que no hay un dimorfismo sexual en cuanto al efecto de la desnutrición sobre el crecimiento fetal de este órgano. Sin embargo, sí parece existir un efecto sexo-dependiente en cuanto a la influencia de la desnutrición materna sobre el

desarrollo del corazón fetal, como demuestra el hecho de que sólo el corazón de los machos MUN presenta un menor peso relativo a G20. En otros modelos experimentales de desnutrición se ha demostrado que demuestran que el número de cardiomiocitos está disminuido al nacimiento en estas condiciones (Corstius et al., 2005). Sin embargo, en estos estudios no se analizan posibles diferencias entre sexos. En el modelo experimental MUN se ha demostrado que en la etapa postnatal se produce un crecimiento acelerado y que algunos órganos y tejidos como la aorta (Gutiérrez-Arzapalo et al., 2017), el tejido adiposo (Muñoz-Valverde et al., 2015) y el corazón (Rodríguez-Rodríguez et al., 2017) sufren hipertrofia que se muestra por igual en ambos sexos excepto la hipertrofia cardíaca que solo aparece en los machos. Los resultados de esta tesis sugieren que la hipertrofia postnatal observada tiene un origen fetal; es decir, aquellos órganos que presentan déficit de crecimiento en la etapa fetal, sufren fenómenos de hipertrofia cuando la disponibilidad de nutrientes vuelve a condiciones óptimas. Estas alteraciones del corazón en los machos MUN pueden estar relacionadas con su mayor predisposición al desarrollo de HTA en la edad adulta (Ross and Beall, 2008; Rodríguez-Rodríguez et al., 2017; Gutiérrez-Arzapalo et al., 2017).

El pobre crecimiento fetal producido por la desnutrición materna se asocia con una menor disponibilidad de nutrientes y con un mayor catabolismo, mediado por niveles elevados de corticosterona fetal. El crecimiento deficiente del corazón en fetos macho puede contribuir al dimorfismo sexual en el desarrollo de HTA.

2. Efecto de la suplementación con ARA+DHA durante la gestación

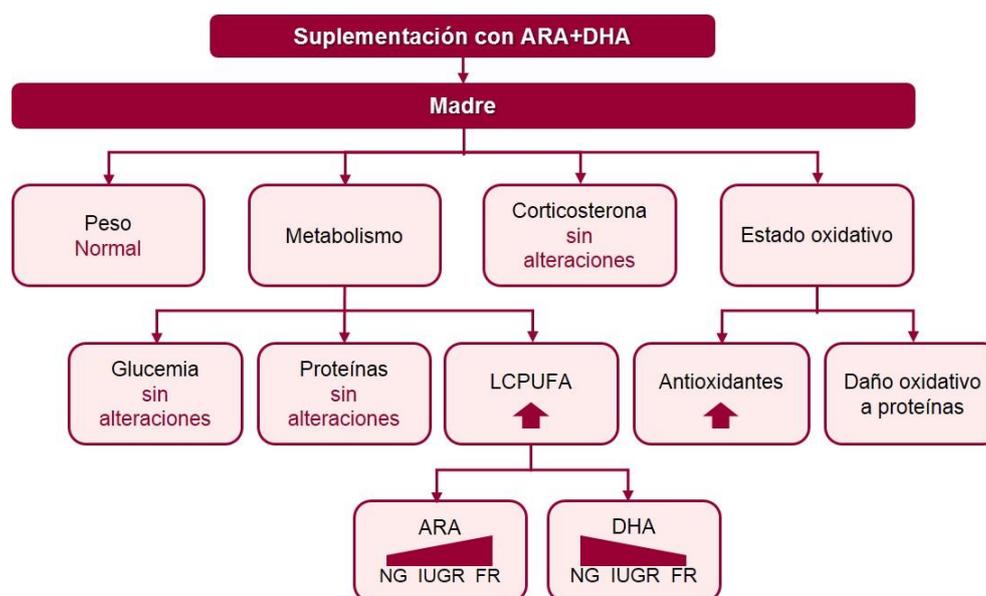
Los LCPUFA, en particular ARA y DHA, son esenciales para el desarrollo fetal principalmente del sistema nervioso, ya que son importantes componentes de los fosfolípidos de membrana (Cetin et al., 2009). La placenta y el feto no poseen suficiente actividad desaturasa para sintetizar estos ácidos grasos, por lo que su fuente principal es de origen materno (Gil-Sánchez et al., 2011). Las dietas occidentales son deficitarias en DHA por lo que frecuentemente se suplementa a la madre durante la gestación con este ácido graso. Sin embargo, metanálisis recientes indican que dicha suplementación no tiene un claro beneficio sobre el desarrollo fetal (Imhoff-Kunsch et al., 2012; Saccone et al., 2015). Este hecho puede estar relacionado con la interacción entre DHA y ARA, ya que comparten enzimas en su ruta de síntesis. Apenas existen datos de la suplementación con ambos ácidos grasos durante la gestación en humanos. Sin embargo, sí hay numerosos estudios con esta intervención durante la lactancia. En ellos se ha observado que si la suplementación no incluye ambos ácidos grasos puede resultar en un impacto negativo en el crecimiento y en el neurodesarrollo (Colombo et al., 2017; Lien et al., 2018). Además, en humanos la leche materna presenta una mayor proporción de ARA que DHA, por lo que las últimas recomendaciones sugieren que la suplementación durante la lactancia debe contener ambos ácidos grasos y con una mayor proporción de ARA. También se ha demostrado que la proporción 1:1 o 1:2 de DHA:ARA favorece el neurodesarrollo en niños prematuros alimentados con fórmula (Hadley et al., 2016).

Por otro lado, estudios en rata también avalan la necesidad de ARA y DHA para el adecuado crecimiento fetal y postnatal. Estos estudios ponen en evidencia que un exceso en DHA restringe el desarrollo fetal relacionado con una disminución de la biodisponibilidad de ARA debido a inhibición de su síntesis por el DHA (Jiménez et al., 2017). La suplementación con ARA en la gestación también es controvertida debido a un posible efecto deletéreo de este ácido graso relacionado con sus propiedades proinflamatorias. Por todo ello consideramos oportuno evaluar en la rata qué efecto tiene una suplementación conjunta con ARA y DHA durante la gestación. Puesto que se ha descrito que la leche materna tiene una mayor proporción de ARA que de

DHA, en esta Tesis utilizamos una proporción 2:1 de estos ácidos grasos. Para fabricar la dieta experimental utilizamos el compuesto Formulaid™, que tiene esta proporción.

Efectos de la suplementación en la madre

Figura 52. Cambios maternos en las ratas suplementadas



LPCUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; ARA, ácido araquidónico; DHA, ácido docosahexaenóico; NG, crecimiento normal; IUGR, restricción del crecimiento intrauterino; FR, reabsorción fetal.

La suplementación con ARA+DHA durante la gestación produjo una menor ganancia de peso a G20. Nuestros datos sugieren que este efecto está relacionado con un deficiente crecimiento de la unidad fetoplacentaria y no parece afectar a la ganancia ponderal de la rata gestante, ya que considerando únicamente el peso de la madre (sin feto ni placenta), éste no se ve afectado por la intervención nutricional. Resultados similares se han encontrado en ratas suplementadas con ω 3 durante la gestación; esta intervención, que produjo deficiencia en el crecimiento fetal, tampoco afectó al peso materno al final de la gestación (Jímenez et al., 2017). Estos datos difieren de los encontrados en el otro modelo experimental utilizado en esta tesis, la rata MUN, en la que la intervención nutricional (reducción de la ingesta en la segunda mitad de la gestación) redujo tanto el peso materno como el peso feto-placentario. Esta diferencia se puede atribuir al hecho de que en la suplementación con ARA+DHA, no se modifica la ingesta calórica, ya que ambas dietas (control y

experimental) son isocalóricas y contienen cantidades similares de macronutrientes mientras que en el modelo MUN, ésta se reduce al 50%. Además, los niveles de glucemia y proteínas plasmáticas no se modificaron en las ratas ED, mientras que en el modelo MUN, se evidencia una disminución en la cantidad de proteínas plasmáticas maternas. Como se ha sugerido en el apartado 1 de la discusión, esta reducción puede estar relacionada con los elevados niveles de corticosterona y su efecto catabólico. Por el contrario, en ratas alimentadas con ED los niveles de esta hormona no se modificaron. Esto sugiere que la suplementación de la dieta con LCPUFA no está siendo percibida como una situación de estrés.

Aunque no se observaron diferencias en las concentraciones de otros nutrientes, en el plasma de ratas alimentadas con ED observamos una mayor proporción de ARA y DHA, lo que significa que estos LCPUFA son absorbidos y están biodisponibles. Los datos también indican que parte del ARA y DHA plasmático procede de biosíntesis en la rata gestante a partir de sus precursores, LA y ALA, respectivamente. El hecho de que los precursores se encuentran en mayor proporción en la dieta que en el plasma materno, sugiere que se están consumiendo para sintetizar ARA y DHA. Nuestros datos también apuntan a que existe una interacción entre la biosíntesis de ambos ácidos grasos, al encontrarse una correlación negativa en sus niveles plasmáticos en las ratas suplementadas. La mayor concentración de ARA en la dieta ED podría interferir con el metabolismo del DHA ya que, estos LCPUFA comparten sistemas enzimáticos. Una interacción similar se ha descrito anteriormente en ratas expuestas a dietas suplementadas con aceite de pescado, elevado en DHA, donde se ha propuesto que el exceso de este ácido graso participa en la reducción de ARA biodisponible a través de la disminución de la expresión de $\Delta 6$ -desaturasa (Jímenez et al., 2017).

Uno de los resultados más relevantes de este estudio fue la evidencia de que la suplementación con ARA+DHA condujo, en general, a un peor desarrollo fetal. Esto sugiere una toxicidad de esta suplementación, ya sea por dosis excesivas o por ser administrados en periodos especialmente vulnerables de la gestación. Datos en la literatura indican que en la rata, una suplementación de hasta 2500mg/kg/día y 1250mg/kg/día de ARA y DHA respectivamente, no resulta

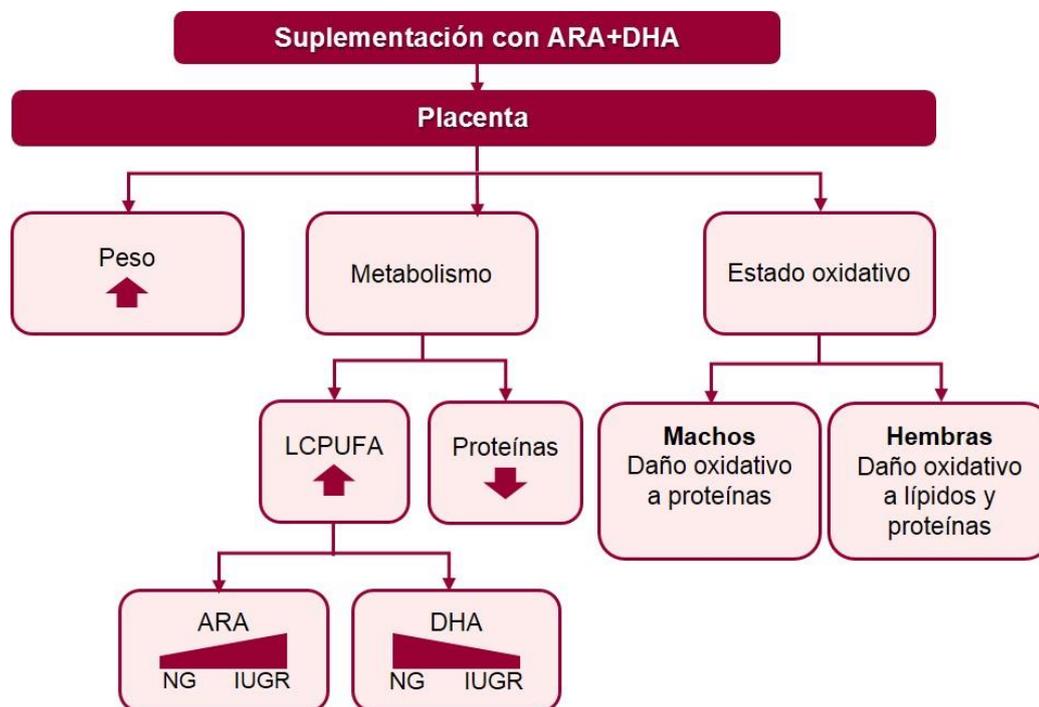
tóxica en la gestación (Arterburn et al., 2000). Puesto que en nuestro caso las concentraciones administradas son muy inferiores a estas (ARA: 405mg/kg/día; DHA: 189mg/kg/día), la razón de la toxicidad observada puede ser atribuida al periodo de administración. En nuestro estudio la suplementación se llevó a cabo durante toda la gestación, mientras que en el estudio de Arterburn solo se administró entre los días 6 a 15. Además, esta sugerencia está apoyada en el hecho de haber encontrado ratas en las que no ha habido descendencia y signos de reabsorción fetal, lo que sugiere problemas en la implantación.

Aunque todas las ratas suplementadas estuvieron sometidas a las mismas condiciones e ingirieron la misma dieta, no todas presentaron alteraciones en el resultado de la gestación. Así, encontramos tres patrones diferentes; algunas de las madres tuvieron camadas de tamaño y crecimiento normal, otras tuvieron camadas con pocas crías y con presencia de IUGR y tres de ellas sufrieron reabsorción fetal. Estos distintos patrones están relacionados con los niveles relativos de ARA y de DHA en el plasma materno. Los resultados sugieren que el ARA tiene un efecto negativo sobre la implantación y el desarrollo fetal, al encontrar que los niveles más altos de ARA se relacionan con madres que tuvieron reabsorción fetal, y los más bajos con madres que desarrollaron una gestación normal. Sugerimos que estos diferentes patrones pudieran ser atribuidos a diferencias en el metabolismo materno, de manera que aquellas ratas con mayor síntesis de ARA, generarían un exceso de este LCPUFA, y que niveles excesivamente altos de ARA podría estar promoviendo procesos inflamatorios. El ARA es una molécula proinflamatoria (Innes and Cadler, 2018) y, en modelos *in vitro* se ha observado que, en exceso, tiene propiedades citotóxicas (Pompeia et al., 2003). Sugerimos que en las ratas que tuvieron reabsorción fetal, el proceso de implantación estaba posiblemente afectado por fenómenos inflamatorios a través de prostaglandinas, moléculas derivadas del ARA, que desempeñan un papel indispensable en la implantación del embrión, pero que en exceso pueden dar lugar a su fracaso (Sallen, 2014).

El DHA y ARA de la dieta están disponibles en el plasma, existiendo también biosíntesis a partir de sus precursores. Un exceso de ARA interfiere en la biodisponibilidad de DHA y se relaciona con alteraciones en la implantación y el desarrollo fetal, posiblemente relacionado procesos inflamatorios.

Alteraciones en la placenta

Figura 53. Alteraciones en la placenta de las ratas suplementadas



LCPUFA, ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga; ARA, ácido araquidónico; DHA, ácido docosahexaenóico; NG, crecimiento normal; IUGR, restricción del crecimiento intrauterino; FR, reabsorción fetal.

Como se mencionó anteriormente, los nutrientes de la circulación materna absorbidos por la placenta se utilizan para su propio desarrollo y función, así como para asegurar un ambiente estable para el crecimiento y desarrollo fetal (Herrera, 2002; Brett et al., 2014). Entre los diversos nutrientes, los ácidos grasos, especialmente los LCPUFA, son uno de los nutrientes más importantes para la placenta desde el momento de la implantación, ya que ésta requiere una fuente de energía abundante y constante y los utiliza como combustible metabólico (Rakheja et al., 2002). Por otro lado, la obtención de ácidos grasos por el feto depende de la dieta materna, así como del transporte y metabolismo placentario (Haggarty, 2010). La actividad de las desaturasas $\Delta 5$ y $\Delta 6$, las dos enzimas clave requeridas para la conversión de LA y ALA en ARA y DHA respectivamente, no son detectables en la placenta humana, lo que sugiere que ésta carece de la capacidad de síntesis de estos LCPUFA. Nuestros resultados también apoyan que el contenido de ARA y DHA en la placenta procede de la circulación materna y que no hay síntesis placentaria. Por lo

tanto, la capacidad de la placenta para extraer estos LCPUFA de la circulación materna y de transportarlos al feto es una cuestión determinante para el desarrollo fetal (Leghi and Muhlhausler, 2016).

En nuestro estudio, el peso de la placenta fue mayor en las ratas expuestas a ED y se encontró un paralelismo cercano entre los niveles de ARA y DHA en el plasma materno y en la placenta. Esto sugiere que los LCPUFA podrían estarse acumulando en la placenta, utilizándose para su crecimiento y podrían no estar disponibles para el feto. Resultados similares se han encontrado en embarazos con IUGR en humanos, en los que se encuentra un mayor contenido LCPUFA en la placenta y donde se almacenan preferentemente, reduciéndose su disponibilidad para el feto (Chassen et al., 2017). En ratas alimentadas con ED se observó que existía una relación directa entre los niveles placentarios de ARA y un pobre crecimiento fetal, mientras que las placentas de las camadas con crecimiento normal tenían los niveles más bajos de ARA y más altos de DHA. Se han observado resultados similares en ratas alimentadas con dietas enriquecidas con LCPUFA, donde las concentraciones más altas de ARA se asocian con peor crecimiento fetal y mayor peso de la placenta (Herrera, 2002).

Como se mencionó en la primera parte de la discusión, la gestación está asociada a una elevación en la producción de ROS en la placenta, con funciones fisiológicas. En condiciones normales esta elevación está equilibrada con un aumento en los antioxidantes maternos. Sin embargo, si existe un desequilibrio entre esta elevación y los sistemas antioxidantes puede producirse una situación de estrés oxidativo (Duhig et al., 2016; Espinosa-Diez et al., 2015). Un estado pro-oxidativo de la placenta puede afectar al crecimiento fetal, tal y como se ha descrito en algunas patologías gestacionales como la PE (Aouache et al., 2018) y el IUGR (Biri et al., 2007), asociadas con bajo peso al nacer. Uno de nuestros objetivos fue evaluar si los LCPUFA de la ED, tenían un efecto sobre el estado oxidativo de la placenta, ya que este aspecto aun es controvertido. En nuestro estudio, encontramos mayores niveles oxidación a proteínas y lípidos en las placentas del grupo ED, lo que sugiere que la suplementación con ARA+DHA promueve el estrés oxidativo de la placenta. Aunque en este modelo no se analizaron las enzimas implicadas

en el balance redox, al igual que ocurre en el modelo MUN, sugerimos que este estado pro-oxidativo de la placenta está relacionado con un exceso de producción de ROS, y que la elevación de algunos antioxidantes en el plasma materno es un posible mecanismo compensatorio aunque insuficiente. No creemos que este efecto esté relacionado con la oxidación de la dieta, ya que se preparó en una atmósfera libre de oxígeno, el Formulaid™ contiene antioxidantes y el pienso se conservó a temperatura fría.

Nuestros resultados sugieren que el ARA de la ED parece ser el ácido graso con efectos negativos, como demuestra el hecho de la correlación positiva entre los niveles maternos de ARA y la peroxidación lipídica de la placenta. Diversos estudios sugieren una implicación del ARA en los procesos oxidativos, probablemente a través de la inducción de un entorno inflamatorio, mediado por eicosanoides derivados de ARA (Calder, 2017). Por otro lado, el hecho que no se observe asociación entre los niveles de DHA materno y el daño oxidativo de la placenta sugiere que el DHA no está implicado en este proceso, aunque sí podría sufrir procesos de peroxidación lipídica (al igual que el ARA) debido a su alto grado de insaturación (Song et al., 2000; Nowak, 2013). De forma similar a lo observado en el modelo MUN, la placenta femenina parece ser más susceptible de fenómenos oxidativos. Aunque no determinamos la expresión de enzimas específicas, es posible que esta mayor susceptibilidad esté relacionada con una menor expresión de estas enzimas antioxidantes.

El ARA y DHA de la dieta ED se acumulan en la placenta, contribuyendo a su crecimiento. Los altos niveles de ARA materno se asocian a peroxidación lipídica de la placenta, posiblemente relacionado con fenómenos inflamatorios. Existe un dimorfismo sexual en la respuesta de la placenta a la oxidación con una mayor susceptibilidad en hembras.

Efectos en el feto

Figura 54. Cambios fetales tras la suplementación con ARA+DHA



La dieta experimental restringió el crecimiento fetal, evidenciado por el menor peso y la longitud de los fetos. Exploramos si los efectos perjudiciales de la dieta experimental sobre el crecimiento fetal podrían atribuirse al ARA o al DHA. Nuestros datos apuntan al exceso de ARA como responsable del deficiente crecimiento fetal, como demuestra la correlación negativa entre la concentración de ARA en la placenta y el peso fetal. Por el contrario, el DHA muestra una relación positiva, sugiriendo un efecto protector sobre el crecimiento fetal. Existen diversos estudios en donde entre los beneficios del DHA se encuentra un mayor peso al nacer (Carlson et al., 2013).

A diferencia de nuestros resultados, en el estudio de Arterburn y colaboradores se encontró que concentraciones ARA superiores a las nuestras no restringió el crecimiento fetal. Sin embargo, esta intervención se realizó durante los días 6 a 15 de gestación (Arterburn et al., 2000), lo que sugiere que los resultados negativos de nuestro estudio podrían estar relacionados con el mayor tiempo de exposición fetal a la dieta. El tiempo de intervención más prolongado también puede explicar que el efecto negativo sobre el crecimiento fetal observado tras la suplementación con ARA+DHA fue incluso más acentuado que el inducido por la restricción nutricional.

En relación al mecanismo responsable, sugerimos que el IUGR inducido por el ARA posiblemente está relacionado con fenómenos inflamatorios y oxidativos

de la placenta. Un exceso de ARA y, por consiguiente, de inflamación en la etapa de implantación puede explicar la reabsorción fetal observada en nuestro estudio. Existe evidencia de que la inflamación desempeña un papel central en la fisiopatología del aborto espontáneo, ya que varios estudios han detectado niveles elevados de citoquinas y quimiocinas inflamatorias tanto de manera sistémica como localmente en la placenta (Robb et al., 2017). Por otra parte, sugerimos que el exceso de ARA durante el periodo de organogénesis también explica la restricción del crecimiento observado. Los efectos del ARA sobre el crecimiento fetal también parecen estar asociados con un estado pro-oxidativo de la placenta, como demuestra la correlación negativa observada entre la peroxidación lipídica placentaria y el peso fetal.

Observamos que el efecto negativo de la intervención sobre el crecimiento corporal con la dieta fue más acentuado en las hembras. Se ha propuesto que las respuestas de la placenta en roedores a la dieta materna presentan un pronunciado dimorfismo sexual, ya que la placenta femenina es más sensible a las intervenciones nutricionales con un cambio mayor en la expresión génica (Mao et al., 2010). En principio cabe esperar que la placenta femenina esté mejor adaptada ante ambientes intrauterinos adversos. Sin embargo, nuestros resultados indican que la placenta de hembras del grupo ED presentan mayores niveles de estrés oxidativo. Sugerimos que este hecho está relacionado con el peor crecimiento observado en las hembras (24% menor que fetos control) en comparación con los machos (19% menor que los fetos control). Además, se encontró una correlación negativa entre los niveles de peroxidación lipídica y el peso de los fetos hembra.

La exposición a la dieta suplementada también indujo una reducción del peso relativo tanto del riñón como del corazón. Estos datos no han sido previamente descritos en la literatura y muestran un patrón similar al observado en las ratas MUN. Esto sugiere que esta intervención nutricional que compromete el crecimiento de órganos importantes en el control cardiovascular, también podría predisponer el desarrollo posterior de enfermedades cardiometabólicas. Asimismo se encontró el mismo dimorfismo sexual en las alteraciones orgánicas con un menor peso del corazón solo en machos, lo que apoya que a largo plazo los machos pudieran desarrollar HTA. Esta hipótesis podría ser

confirmada realizando un seguimiento de la camada a largo plazo. Las alteraciones en el crecimiento no parecen estar relacionadas con la corticosterona ya que esta hormona no se encontró elevada ni en la madre ni en el feto.

La suplementación con ARA+DHA durante toda la gestación interfiere con la implantación y el crecimiento fetal, probablemente debido al período de intervención durante toda la gestación. Los efectos negativos de la dieta sobre el crecimiento fetal están relacionados con el ARA y no con el DHA, posiblemente a través de estrés oxidativo e inflamación de la placenta. El mayor daño oxidativo en la placenta femenina está relacionado con un peor crecimiento en las hembras. Sin embargo, los efectos deletéreos de la suplementación sobre el crecimiento del corazón son más marcados en machos, lo que podría estar relacionado con la programación fetal de enfermedad cardiometabólica en la edad adulta.

CONCLUSIONES
CONCLUSIONS

CONCLUSIONES

La restricción nutricional durante la segunda mitad de la gestación, en la rata:

1. Aumenta el catabolismo materno, asociado a la elevación de corticosterona, lo que permite mantener la glucemia, probablemente mediante gluconeogénesis a partir de aminoácidos.
2. Incrementa los antioxidantes plasmáticos, como mecanismo compensatorio ante una elevación de ROS asociada al mayor catabolismo.
3. Induce un deficiente desarrollo de la placenta, sin cambios aparentes en la angiogénesis y daño oxidativo, que es más acentuado en las hembras.
4. El daño oxidativo placentario presenta dimorfismo sexual, siendo consecuencia de la elevación de enzimas productoras de ROS en los machos y de la disminución de enzimas antioxidantes en las hembras.
5. Produce, en ambos sexos, restricción del crecimiento intrauterino asociado con una menor disponibilidad de proteínas y LCPUFA del feto y con el daño oxidativo de la placenta.
6. Produce una deficiencia en el desarrollo renal en ambos sexos, mientras que solo afecta al crecimiento del corazón en machos; esto podría estar relacionado con la mayor susceptibilidad del sexo masculino al desarrollo de HTA y disfunción cardíaca.

La suplementación de la dieta con ARA+DHA durante toda la gestación, en la rata:

1. Aumenta la disponibilidad de ARA y DHA en el plasma materno, por su absorción desde la dieta y la síntesis a partir de sus precursores, existiendo una correlación negativa en la disponibilidad de ambos ácidos grasos.
2. Produce restricción del crecimiento intrauterino asociado con los niveles de ARA, pero no de DHA, y con estrés oxidativo de la placenta.
3. El mayor impacto de la dieta sobre el crecimiento fetal en las hembras se asocia con un mayor daño oxidativo placentario.
4. No presenta dimorfismo sexual en el desarrollo renal pero induce un peor desarrollo cardíaco en machos.

Considerando de manera global, los resultados de esta tesis permiten concluir que diferentes desequilibrios nutricionales durante la gestación tienen en común:

- Un estado pro-oxidativo en la placenta que participa en la restricción del crecimiento fetal.
- Un peor desarrollo del corazón en los machos, que es independiente de las alteraciones de la placenta, y puede contribuir al dimorfismo sexual en la programación fetal de la enfermedad cardiovascular.

CONCLUSIONS

Nutritional restriction during the second half of pregnancy in the rat:

1. Increases maternal catabolism, associated with the elevation of corticosterone, which allows maintaining glycemia, probably by gluconeogenesis from amino acids.
2. Increases plasma antioxidants, as a compensatory mechanism against an increase in ROS associated with elevated catabolism.
3. Induces a poor development of the placenta, with no apparent changes in angiogenesis and generates placenta oxidative damage, with a higher impact in females.
4. Placental oxidative damage has a sexual dimorphism, being consequence of the elevation in ROS-producing enzymes in males and the decrease in antioxidant enzymes in females.
5. Produces, intrauterine growth restriction in both sexes, which is associated with a lower availability of proteins and LCPUFA in the fetus and with oxidative damage of the placenta.
6. Produces a deficiency in renal development in both sexes, while it affects heart growth only in males; this could be related to the greater susceptibility of male sex to develop hypertension and cardiac dysfunction.

Diet supplementation with ARA + DHA throughout pregnancy in the rat:

1. Increases the availability of ARA and DHA in the maternal plasma, through absorption from the diet as well as from synthesis from their precursors, with a negative correlation between both fatty acids.
2. Produces intrauterine growth restriction associated with ARA, but not DHA levels, and with oxidative stress of the placenta.
3. The greater impact of diet on fetal growth in females is associated with greater placental oxidative damage.
4. It does not present sexual dimorphism in the renal development but induces a worse cardiac development in males.

Considering these data globally, the results of this Thesis allow to conclude that different nutritional imbalances during pregnancy have in common:

- A pro-oxidative state in the placenta that participates in the restriction of fetal growth.
- A worse development of the heart in males, which is independent of alterations of the placenta, and may contribute to sexual dimorphism in the fetal programming of cardiovascular diseases.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Alexander BT, Dasinger JH, Intapad S. Fetal programming and cardiovascular pathology. *Compr Physiol* 2015 Apr;5(2):997-1025.

Al-Gubory KH. Multiple exposures to environmental pollutants and oxidative stress: Is there a sex specific risk of developmental complications for fetuses? *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews* 2016;108(4):351-364.

Amusquivar E, Ruperez FJ, Barbas C, Herrera E. Low arachidonic acid rather than alpha-tocopherol is responsible for the delayed postnatal development in offspring of rats fed fish oil instead of olive oil during pregnancy and lactation. *J Nutr* 2000 Nov;130(11):2855-2865.

Armitage JA, Lakasing L, Taylor PD, Balachandran AA, Jensen RI, Dekou V, et al. Developmental programming of aortic and renal structure in offspring of rats fed fat-rich diets in pregnancy. *J Physiol* 2005 May 15;565(Pt 1):171-184.

Arterburn LM, Boswell KD, Henwood SM, Kyle DJ. A developmental safety study in rats using DHA- and ARA-rich single-cell oils. *Food Chem Toxicol* 2000 Sep;38(9):763-771.

Aouache R, Biquard L, Vaiman D, Miralles F. Oxidative Stress in Preeclampsia and Placental Diseases. *Int J Mol Sci* 2018 May 17;19(5):10.3390/ijms19051496.

Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. *Biol Chem* 2009 Mar;390(3):191-214.

Banderali G, Martelli A, Landi M, Moretti F, Betti F, Radaelli G, et al. Short and long term health effects of parental tobacco smoking during pregnancy and lactation: a descriptive review. *Journal of translational medicine* 2015;13(1):327.

Barker DJ, Hales CN, Fall C, Osmond C, Phipps K, Clark P. Type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus, hypertension and hyperlipidaemia (syndrome X): relation to reduced fetal growth. *Diabetologia* 1993;36(1):62-67.

Barker DJ, Osmond C. Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *The Lancet* 1986;327(8489):1077-1081.

Barker DJ. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol* 2006 Jun;49(2):270-283.

Barker DJ, Clark PM. Fetal undernutrition and disease in later life. *Rev Reprod* 1997 May;2(2):105-112.

Barker DJ, Osmond C. Low birth weight and hypertension. *BMJ* 1988 Jul 9;297(6641):134-135.

Basso O, Wilcox A. Mortality risk among preterm babies: immaturity versus underlying pathology. *Epidemiology* 2010 Jul;21(4):521-527.

Bayman E, Drake AJ, Piyasena C. Prematurity and programming of cardiovascular disease risk: a future challenge for public health? *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2014 Nov;99(6):F510-4.

Belkacemi L, Chen CH, Ross MG, Desai M. Increased placental apoptosis in maternal food restricted gestations: role of the Fas pathway. *Placenta* 2009 Sep;30(9):739-751.

Belkacemi L, Jelks A, Chen CH, Ross MG, Desai M. Altered placental development in undernourished rats: role of maternal glucocorticoids. *Reprod Biol Endocrinol* 2011 Aug 1;9:105-7827-9-105.

Benton SJ, Hu Y, Xie F, Kupfer K, Lee SW, Magee LA, et al. Can placental growth factor in maternal circulation identify fetuses with placental intrauterine growth restriction? *Am J Obstet Gynecol* 2012 Feb;206(2):163.e1-163.e7.

Bergen HT. Exposure to smoke during development: fetal programming of adult disease. *Tobacco Induced Diseases* 2006;3(2):5.

Berlett BS, Stadtman ER. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J Biol Chem* 1997 Aug 15;272(33):20313-20316.

Biri A, Bozkurt N, Turp A, Kavutcu M, Himmetoglu O, Durak I. Role of oxidative stress in intrauterine growth restriction. *Gynecol Obstet Invest* 2007;64(4):187-192.

Bogdarina I, Welham S, King PJ, Burns SP, Clark AJ. Epigenetic modification of the renin-angiotensin system in the fetal programming of hypertension. *Circ Res* 2007 Mar 2;100(4):520-526.

Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 2005 Mar;115(3):e290-6.

Bosco C, Diaz E. Placental hypoxia and foetal development versus alcohol exposure in pregnancy. *Alcohol and alcoholism* 2012;47(2):109-117.

Breart G, Barros H, Wagener Y, Prati S. Characteristics of the childbearing population in Europe. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2003 Nov 28;111 Suppl 1:S45-52.

Brett K, Ferraro Z, Yockell-Lelievre J, Gruslin A, Adamo K. Maternal–fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *International journal of molecular sciences* 2014;15(9):16153-16185.

Brodsky D, Christou H. Current concepts in intrauterine growth restriction. *J Intensive Care Med* 2004 Nov-Dec;19(6):307-319.

Buckley AJ, Keserü B, Briody J, Thompson M, Ozanne SE, Thompson CH. Altered body composition and metabolism in the male offspring of high fat–fed rats. *Metab Clin Exp* 2005;54(4):500-507.

Burdge GC, Hanson MA, Slater-Jefferies JL, Lillycrop KA. Epigenetic regulation of transcription: a mechanism for inducing variations in phenotype (fetal programming) by differences in nutrition during early life? *Br J Nutr* 2007 Jun;97(6):1036-1046.

Burdge GC, Slater-Jefferies J, Torrens C, Phillips ES, Hanson MA, Lillycrop KA. Dietary protein restriction of pregnant rats in the F0 generation induces altered methylation of hepatic gene promoters in the adult male offspring in the F1 and F2 generations. *Br J Nutr* 2007 Mar;97(3):435-439.

Calder PC. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. *Biochem Soc Trans* 2017 Oct 15;45(5):1105-1115.

Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: New twists in an old tale. *Biochimie* 2009 Jun;91(6):791-795.

Carlson SE, Colombo J, Gajewski BJ, Gustafson KM, Mundy D, Yeast J, et al. DHA supplementation and pregnancy outcomes. *Am J Clin Nutr* 2013 Apr;97(4):808-815.

Carnielli VP, Pederzini F, Vittorangeli R, Luijendijk IH, Boomaars WE, Pedrotti D, et al. Plasma and red blood cell fatty acid of very low birth weight infants fed exclusively with expressed preterm human milk. *Pediatr Res* 1996 Apr;39(4 Pt 1):671-679.

Cetin I, Antonazzo P. The role of the placenta in intrauterine growth restriction (IUGR). *Z Geburtshilfe Neonatol* 2009 Jun;213(3):84-88.

Cetin I, Giovannini N, Alvino G, Agostoni C, Riva E, Giovannini M, et al. Intrauterine growth restriction is associated with changes in polyunsaturated fatty acid fetal-maternal relationships. *Pediatr Res* 2002 Nov;52(5):750-755.

Chassen SS, Ferchaud-Roucher V, Gupta MB, Jansson T, Powell TL. Alterations in placental long chain polyunsaturated fatty acid metabolism in human intrauterine growth restriction. *Clin Sci (Lond)* 2018 Mar 15;132(5):595-607.

Chau K, Hennessy A, Makris A. Placental growth factor and pre-eclampsia. *J Hum Hypertens* 2017 Dec;31(12):782-786.

Christiansen JJ, Djurhuus CB, Gravholt CH, Iversen P, Christiansen JS, Schmitz O, et al. Effects of cortisol on carbohydrate, lipid, and protein metabolism: studies of acute cortisol withdrawal in adrenocortical failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 Sep;92(9):3553-3559.

Clifton VL. Review: Sex and the human placenta: mediating differential strategies of fetal growth and survival. *Placenta* 2010 Mar;31 Suppl:S33-9.

Cohen E, Wong FY, Horne RS, Yiallourou SR. Intrauterine growth restriction: impact on cardiovascular development and function throughout infancy. *Pediatr Res* 2016 Jun;79(6):821-830.

Colombo J, Jill Shaddy D, Kerling EH, Gustafson KM, Carlson SE. Docosahexaenoic acid (DHA) and arachidonic acid (ARA) balance in developmental outcomes. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2017 Jun;121:52-56.

Corstius HB, Zimanyi MA, Maka N, Herath T, Thomas W, van der Laarse A, et al. Effect of intrauterine growth restriction on the number of cardiomyocytes in rat hearts. *Pediatr Res* 2005 Jun;57(6):796-800.

Desai M, Gayle D, Babu J, Ross MG. Programmed obesity in intrauterine growth-restricted newborns: modulation by newborn nutrition. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2005 Jan;288(1):R91-6.

DiGiacomo JE, Hay WW, Jr. Regulation of placental glucose transfer and consumption by fetal glucose production. *Pediatr Res* 1989 May;25(5):429-434.

Dizdaroglu M, Jaruga P, Birincioglu M, Rodriguez H. Free radical-induced damage to DNA: mechanisms and measurement. *Free Radic Biol Med* 2002 Jun 1;32(11):1102-1115.

Domellof M. Iron and other micronutrient deficiencies in low-birthweight infants. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser* 2013;74:197-206.

Dreissigacker U, Suchy MT, Maassen N, Tsikas D. Human plasma concentrations of malondialdehyde (MDA) and the F2-isoprostane 15(S)-8-iso-PGF(2alpha) may be markedly compromised by hemolysis: evidence by GC-MS/MS and potential analytical and biological ramifications. *Clin Biochem* 2010 Jan;43(1-2):159-167.

Duhig K, Chappell LC, Shennan AH. Oxidative stress in pregnancy and reproduction. *Obstet Med* 2016 Sep;9(3):113-116.

Duttaroy AK. Fetal growth and development: roles of fatty acid transport proteins and nuclear transcription factors in human placenta. *Indian J Exp Biol* 2004 Aug;42(8):747-757.

Duttaroy AK. Cellular uptake of long-chain fatty acids: role of membrane-associated fatty-acid-binding/transport proteins. *Cell Mol Life Sci* 2000 Sep;57(10):1360-1372.

El Assar M, Angulo J, Rodriguez-Manas L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free Radic Biol Med* 2013 Dec;65:380-401.

Elmes MJ, Gardner DS, Langley-Evans SC. Fetal exposure to a maternal low-protein diet is associated with altered left ventricular pressure response to ischaemia-reperfusion injury. *Br J Nutr* 2007 Jul;98(1):93-100.

Ergaz Z, Avgil M, Ornoy A. Intrauterine growth restriction—etiology and consequences: what do we know about the human situation and experimental animal models? *Reproductive Toxicology* 2005;20(3):301-322.

Eriksson JG, Kajantie E, Osmond C, Thornburg K, Barker DJ. Boys live dangerously in the womb. *Am J Hum Biol* 2010 May-Jun;22(3):330-335.

Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sanchez-Perez P, Cadenas S, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol* 2015 Dec;6:183-197.

Faraci M, Renda E, Monte S, Di Prima FA, Valenti O, De Domenico R, et al. Fetal growth restriction: current perspectives. *J Prenat Med* 2011 Apr;5(2):31-33.

Fonseca BM, Correia-da-Silva G, Teixeira NA. The rat as an animal model for fetoplacental development: a reappraisal of the post-implantation period. *Reprod Biol* 2012 Jul;12(2):97-118.

Forest S, Priest S. Intrauterine tobacco smoke exposure and congenital heart defects. *J Perinat Neonatal Nurs* 2016;30(1):54-63.

Forsdahl A. Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med* 1977 Jun;31(2):91-95.

Gabory A, Roseboom TJ, Moore T, Moore LG, Junien C. Placental contribution to the origins of sexual dimorphism in health and diseases: sex chromosomes and epigenetics. *Biol Sex Differ* 2013 Mar 21;4(1):5-6410-4-5.

Ganchimeg T, Ota E, Morisaki N, Laopaiboon M, Lumbiganon P, Zhang J, et al. Pregnancy and childbirth outcomes among adolescent mothers: a World Health Organization multicountry study. *BJOG* 2014 Mar;121 Suppl 1:40-48.

Gezmish O, Tare M, Parkington HC, Morley R, Porrello ER, Bubb KJ, et al. Maternal vitamin D deficiency leads to cardiac hypertrophy in rat offspring. *Reprod Sci* 2010 Feb;17(2):168-176.

Gicquel C, El-Osta A, Le Bouc Y. Epigenetic regulation and fetal programming. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008 Feb;22(1):1-16.

Gil-Sanchez A, Demmelmair H, Parrilla JJ, Koletzko B, Larque E. Mechanisms involved in the selective transfer of long chain polyunsaturated Fatty acids to the fetus. *Front Genet* 2011 Sep 6;2:57.

Gil-Sanchez A, Koletzko B, Larque E. Current understanding of placental fatty acid transport. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2012 May;15(3):265-272.

Gluckman PD, Hanson MA, Buklijas T, Low FM, Beedle AS. Epigenetic mechanisms that underpin metabolic and cardiovascular diseases. *Nat Rev Endocrinol* 2009 Jul;5(7):401-408.

Godfrey KM. The role of the placenta in fetal programming—a review. *Placenta* 2002;23:S20-S27.

Gomez Candela C, Bermejo Lopez LM, Loria Kohen V. Importance of a balanced omega 6/omega 3 ratio for the maintenance of health: nutritional recommendations. *Nutr Hosp* 2011 Mar-Apr;26(2):323-329.

Gow RV, Hibbeln JR. Omega-3 fatty acid and nutrient deficits in adverse neurodevelopment and childhood behaviors. *Child Adolesc Psychiatr Clin N Am* 2014 Jul;23(3):555-590.

Gray SP, Denton KM, Cullen-McEwen L, Bertram JF, Moritz KM. Prenatal exposure to alcohol reduces nephron number and raises blood pressure in progeny. *J Am Soc Nephrol* 2010 Nov;21(11):1891-1902.

Griendling KK, Touyz RM, Zweier JL, Dikalov S, Chilian W, Chen YR, et al. Measurement of Reactive Oxygen Species, Reactive Nitrogen Species, and Redox-Dependent Signaling in the Cardiovascular System: A Scientific Statement From the American Heart Association. *Circ Res* 2016 Aug 19;119(5):e39-75.

Grigore D, Ojeda NB, Alexander BT. Sex differences in the fetal programming of hypertension. *Gender medicine* 2008;5:S121-S132.

Gutierrez-Arzapalo PY, Rodriguez-Rodriguez P, Ramiro-Cortijo D, Lopez de Pablo AL, Lopez-Gimenez MR, Condezo-Hoyos L, et al. Role of fetal nutrient restriction and postnatal catch-up growth on structural and mechanical alterations of rat aorta. *J Physiol* 2017 Dec 26.

Haggarty P. Fatty acid supply to the human fetus. *Annu Rev Nutr* 2010 Aug 21;30:237-255.

Halliwell B. The antioxidant paradox: less paradoxical now? *Br J Clin Pharmacol* 2013 Mar;75(3):637-644.

Harris A, Seckl J. Glucocorticoids, prenatal stress and the programming of disease. *Horm Behav* 2011;59(3):279-289.

Hayyan M, Hashim MA, AlNashef IM. Superoxide Ion: Generation and Chemical Implications. *Chem Rev* 2016 Mar 9;116(5):3029-3085.

Heijmans BT, Tobi EW, Stein AD, Putter H, Blauw GJ, Susser ES, et al. Persistent epigenetic differences associated with prenatal exposure to famine in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Nov 4;105(44):17046-17049.

Hermann M, Flammer A, Luscher TF. Nitric oxide in hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 2006 Dec;8(12 Suppl 4):17-29.

Herrera E. Implications of dietary fatty acids during pregnancy on placental, fetal and postnatal development--a review. *Placenta* 2002 Apr;23 Suppl A:S9-19.

Herrera E, Ortega-Senovilla H. Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth. *Curr Pharm Biotechnol* 2014;15(1):24-31.

Hershkovitz D, Burbea Z, Skorecki K, Brenner BM. Fetal programming of adult kidney disease: cellular and molecular mechanisms. *Clin J Am Soc Nephrol* 2007 Mar;2(2):334-342.

Hu XW, Levy A, Hart EJ, Nolan LA, Dalton GR, Levi AJ. Intra-uterine growth retardation results in increased cardiac arrhythmias and raised diastolic blood pressure in adult rats. *Cardiovasc Res* 2000 Nov;48(2):233-243.

Hult M, Tornhammar P, Ueda P, Chima C, Bonamy AE, Ozumba B, et al. Hypertension, diabetes and overweight: looming legacies of the Biafran famine. *PLoS One* 2010;5(10):e13582.

Huppertz B and Kingdom JCP. The Placenta and Fetal Membranes. En: Edmonds DK (ed.). *Dewhurst's Textbook of Obstetrics & Gynaecology*. 8^{va} Edición. Wiley-Blackwell; 2012.

Imhoff-Kunsch B, Briggs V, Goldenberg T, Ramakrishnan U. Effect of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acid intake during pregnancy on maternal, infant, and child health outcomes: a systematic review. *Paediatr Perinat Epidemiol* 2012 Jul;26 Suppl 1:91-107.

Ingelfinger JR, Nuyt A. Impact of fetal programming, birth weight, and infant feeding on later hypertension. *The Journal of Clinical Hypertension* 2012;14(6):365-371.

Innes JK, Calder PC. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2018 May;132:41-48.

Innis SM. Essential fatty acid transfer and fetal development. *Placenta* 2005 Apr;26 Suppl A:S70-5.

Irgens HU, Reisaeter L, Irgens LM, Lie RT. Long term mortality of mothers and fathers after pre-eclampsia: population based cohort study. *BMJ* 2001 Nov 24;323(7323):1213-1217.

Janot M, Cortes-Dubly M, Rodriguez S, Huynh-Do U. Bilateral uterine vessel ligation as a model of intrauterine growth restriction in mice. *Reproductive biology and endocrinology* 2014;12(1):62.

Januar V, Desoye G, Novakovic B, Cvitic S, Saffery R. Epigenetic regulation of human placental function and pregnancy outcome: considerations for causal inference. *Am J Obstet Gynecol* 2015 Oct;213(4 Suppl):S182-96.

Jimenez MJ, Bocos C, Panadero M, Herrera E. Fish oil diet in pregnancy and lactation reduces pup weight and modifies newborn hepatic metabolic adaptations in rats. *Eur J Nutr* 2017 Feb;56(1):409-420.

Jin J. JAMA patient page. Babies with low birth weight. *JAMA* 2015 Jan 27;313(4):432.

Joint WHO/FAO/UNU Expert Consultation. Protein and amino acid requirements in human nutrition. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2007;(935)(935):1-265, back cover.

Jovanovic L, Pettitt DJ. Gestational diabetes mellitus. *JAMA* 2001 Nov 28;286(20):2516-2518.

Jump DB. The biochemistry of n-3 polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 2002 Mar 15;277(11):8755-8758.

Kajantie E, Dunkel L, Turpeinen U, Stenman UH, Wood PJ, Nuutila M, et al. Placental 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase-2 and fetal cortisol/cortisone shuttle in small preterm infants. *J Clin Endocrinol Metab* 2003 Jan;88(1):493-500.

Kalisch-Smith JI, Simmons DG, Dickinson H, Moritz KM. Review: Sexual dimorphism in the formation, function and adaptation of the placenta. *Placenta* 2017 Jun;54:10-16.

Kelley EE, Khoo NK, Hundley NJ, Malik UZ, Freeman BA, Tarpey MM. Hydrogen peroxide is the major oxidant product of xanthine oxidase. *Free Radic Biol Med* 2010 Feb 15;48(4):493-498.

Khan IY, Dekou V, Douglas G, Jensen R, Hanson MA, Poston L, et al. A high-fat diet during rat pregnancy or suckling induces cardiovascular dysfunction in adult offspring. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 2005;288(1):R127-R133.

Kominiarek MA, Rajan P. Nutrition Recommendations in Pregnancy and Lactation. *Med Clin North Am* 2016 Nov;100(6):1199-1215.

Kulkarni AV, Mehendale SS, Yadav HR, Joshi SR. Reduced placental docosahexaenoic acid levels associated with increased levels of sFlt-1 in preeclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2011 Jan-Feb;84(1-2):51-55.

Lain KY, Catalano PM. Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol* 2007 Dec;50(4):938-948.

Langley-Evans SC, Phillips GJ, Benediktsson R, Gardner DS, Edwards CR, Jackson AA, et al. Protein intake in pregnancy, placental glucocorticoid metabolism and the programming of hypertension in the rat. *Placenta* 1996 Mar-Apr;17(2-3):169-172.

Lauritzen L, Fewtrell M, Agostoni C. Dietary arachidonic acid in perinatal nutrition: a commentary. *Pediatr Res* 2015 Jan;77(1-2):263-269.

Lee AJ, Hiscock RJ, Wein P, Walker SP, Permezel M. Gestational diabetes mellitus: clinical predictors and long-term risk of developing type 2 diabetes: a retrospective cohort study using survival analysis. *Diabetes Care* 2007 Apr;30(4):878-883.

Leeson CP, Kattenhorn M, Morley R, Lucas A, Deanfield JE. Impact of low birth weight and cardiovascular risk factors on endothelial function in early adult life. *Circulation* 2001 Mar 6;103(9):1264-1268.

Leghi GE, Muhlhausler BS. The effect of n-3 LCPUFA supplementation on oxidative stress and inflammation in the placenta and maternal plasma during pregnancy. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2016 Oct;113:33-39.

Lesage J, Blondeau B, Grino M, Breant B, Dupouy JP. Maternal undernutrition during late gestation induces fetal overexposure to glucocorticoids and intrauterine growth retardation, and disturbs the hypothalamo-pituitary adrenal axis in the newborn rat. *Endocrinology* 2001 May;142(5):1692-1702.

Lesage J, Sebaai N, Leonhardt M, Dutriez-Casteloot I, Breton C, Deloof S, et al. Perinatal maternal undernutrition programs the offspring hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Stress* 2006 Dec;9(4):183-198.

Li S, Chen SC, Shlipak M, Bakris G, McCullough PA, Sowers J, et al. Low birth weight is associated with chronic kidney disease only in men. *Kidney Int* 2008 Mar;73(5):637-642.

Lien EL, Richard C, Hoffman DR. DHA and ARA addition to infant formula: Current status and future research directions. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2018 Jan;128:26-40.

Longtine MS, Nelson DM. Placental dysfunction and fetal programming: the importance of placental size, shape, histopathology, and molecular composition. *Semin Reprod Med* 2011 May;29(3):187-196.

Lotito SB, Frei B. Consumption of flavonoid-rich foods and increased plasma antioxidant capacity in humans: cause, consequence, or epiphenomenon? *Free Radic Biol Med* 2006 Dec 15;41(12):1727-1746.

Lumey LH. Compensatory placental growth after restricted maternal nutrition in early pregnancy. *Placenta* 1998 Jan;19(1):105-111.

Luo ZC, Fraser WD, Julien P, Deal CL, Audibert F, Smith GN, et al. Tracing the origins of "fetal origins" of adult diseases: programming by oxidative stress? *Med Hypotheses* 2006;66(1):38-44.

Makrides M, Collins CT, Gibson RA. Impact of fatty acid status on growth and neurobehavioural development in humans. *Matern Child Nutr* 2011 Apr;7 Suppl 2:80-88.

Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr* 2005 Jan;81(1 Suppl):230S-242S.

Manalich R, Reyes L, Herrera M, Melendi C, Fundora I. Relationship between weight at birth and the number and size of renal glomeruli in humans: a histomorphometric study. *Kidney Int* 2000 Aug;58(2):770-773.

Mao J, Zhang X, Sieli PT, Falduto MT, Torres KE, Rosenfeld CS. Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Mar 23;107(12):5557-5562.

Marangoni F, Cetin I, Verduci E, Canzone G, Giovannini M, Scollo P, et al. Maternal Diet and Nutrient Requirements in Pregnancy and Breastfeeding. An Italian Consensus Document. *Nutrients* 2016 Oct 14;8(10):10.3390/nu8100629.

Marchesi C, Ebrahimian T, Angulo O, Paradis P, Schiffrin EL. Endothelial nitric oxide synthase uncoupling and perivascular adipose oxidative stress and inflammation contribute to vascular dysfunction in a rodent model of metabolic syndrome. *Hypertension* 2009 Dec;54(6):1384-1392.

Martyn CN, Greenwald SE. Impaired synthesis of elastin in walls of aorta and large conduit arteries during early development as an initiating event in pathogenesis of systemic hypertension. *Lancet* 1997 Sep 27;350(9082):953-955.

Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 2005 Oct;16(10):577-586.

McCraib GJ, Egan AR and Hosking BJ. Maternal undernutrition during mid-pregnancy in sheep: variable effects on placental growth. *Journal of Agricultural Science* 1992 Feb: 118(1):127-132.

Mennitti LV, Oliveira JL, Morais CA, Estadella D, Oyama LM, Oller do Nascimento CM, et al. Type of fatty acids in maternal diets during pregnancy and/or lactation and metabolic consequences of the offspring. *J Nutr Biochem* 2015 Feb;26(2):99-111.

Miller DM, Buettner GR, Aust SD. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 1990;8(1):95-108.

Mohsenzadeh Y, Rahmani A, Cheraghi J, Pyrani M, Asadollahi K. Prenatal exposure to nicotine in pregnant rat increased inflammatory marker in newborn rat. *Mediators Inflamm* 2014;2014:274048.

Monteiro LJ, Norman JE, Rice GE, Illanes SE. Fetal programming and gestational diabetes mellitus. *Placenta* 2016 Dec;48 Suppl 1:S54-S60.

Moore VM, Davies MJ. Diet during pregnancy, neonatal outcomes and later health. *Reprod Fertil Dev* 2005;17(3):341-348.

Morton JS, Cooke C, Davidge ST. In utero origins of hypertension: mechanisms and targets for therapy. *Physiol Rev* 2016;96(2):549-603.

Munoz-Valverde D, Rodriguez-Rodriguez P, Gutierrez-Arzapalo P, De Pablo AL, González MC, Lopez-Gimenez R, et al. Effect of fetal undernutrition and postnatal overfeeding on rat adipose tissue and organ growth at early stages of postnatal development. *Physiological research* 2015;64(4).

Murphy KE, Willan AR, Hannah ME, Ohlsson A, Kelly EN, Matthews SG, et al. Effect of antenatal corticosteroids on fetal growth and gestational age at birth. *Obstetrics & Gynecology* 2012;119(5):917-923.

Myatt L. Placental adaptive responses and fetal programming. *J Physiol* 2006 Apr 1;572(Pt 1):25-30.

Myatt L. Sexual dimorphism in the placenta. *Pregnancy Hypertension* 2018 Oct; 13:S4-S15.

Myllynen P, Vahakangas K. Placental transfer and metabolism: an overview of the experimental models utilizing human placental tissue. *Toxicol In Vitro* 2013 Feb;27(1):507-512.

Nesterenko TH, Aly H. Fetal and neonatal programming: evidence and clinical implications. *Am J Perinatol* 2009;26(03):191-198.

Newnham JP, Moss TJ, Nitsos I, Sloboda DM, Challis JR. Nutrition and the early origins of adult disease. *Asia Pac J Clin Nutr* 2002;11:S537-S542.

Ni L, Pan Y, Tang C, Xiong W, Wu X, Zou C. Antenatal exposure to betamethasone induces placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase type 2 expression and the adult metabolic disorders in mice. *PLoS one* 2018;13(9):e0203802.

Nishina H, Green LR, McGarrigle HH, Noakes DE, Poston L, Hanson MA. Effect of nutritional restriction in early pregnancy on isolated femoral artery function in mid-gestation fetal sheep. *J Physiol (Lond)* 2003;553(2):637-647.

Nowak JZ. Oxidative stress, polyunsaturated fatty acids-derived oxidation products and bisretinoids as potential inducers of CNS diseases: focus on age-related macular degeneration. *Pharmacol Rep* 2013;65(2):288-304.

Nüsken KD, Dotsch J, Rauh M, Rascher W, Schneider H. Uteroplacental insufficiency after bilateral uterine artery ligation in the rat: impact on postnatal glucose and lipid metabolism and evidence for metabolic programming of the offspring by sham operation. *Endocrinology* 2008 Mar;149(3):1056-1063.

Nuyt AM. Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci (Lond)* 2008 Jan;114(1):1-17.

Ortiz LA, Quan A, Weinberg A, Baum M. Effect of prenatal dexamethasone on rat renal development. *Kidney Int* 2001;59(5):1663-1669.

Ortiz LA, Quan A, Zarzar F, Weinberg A, Baum M. Prenatal dexamethasone programs hypertension and renal injury in the rat. *Hypertension* 2003 Feb;41(2):328-334.

Osgerby JC, Wathes DC, Howard D, Gadd TS. The effect of maternal undernutrition on the placental growth trajectory and the uterine insulin-like growth factor axis in the pregnant ewe. *J Endocrinol* 2004 Jul;182(1):89-103.

Osmond C, Barker DJ. Fetal, infant, and childhood growth are predictors of coronary heart disease, diabetes, and hypertension in adult men and women. *Environ Health Perspect* 2000 Jun;108 Suppl 3:545-553.

Ozaki T, Nishina H, Hanson M, Poston L. Dietary restriction in pregnant rats causes gender-related hypertension and vascular dysfunction in offspring. *J Physiol (Lond)* 2001;530(1):141-152.

Painter RC, Roseboom TJ, Bleker OP. Prenatal exposure to the Dutch famine and disease in later life: an overview. *Reproductive toxicology* 2005;20(3):345-352.

Paixao AD, Alexander BT. How the kidney is impacted by the perinatal maternal environment to develop hypertension. *Biol Reprod* 2013 Dec 19;89(6):144.

Pallotto EK, Kilbride HW. Perinatal outcome and later implications of intrauterine growth restriction. *Clin Obstet Gynecol* 2006 Jun;49(2):257-269.

Phillips PJ, Jeffries B. Gestational diabetes--worth finding and actively treating. *Aust Fam Physician* 2006 Sep;35(9):701-703.

Pisoschi AM, Pop A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem* 2015 Jun 5;97:55-74.

Pompeia C, Lima T, Curi R. Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? *Cell Biochem Funct* 2003 Jun;21(2):97-104.

Poston L, Igosheva N, Mistry HD, Seed PT, Shennan AH, Rana S, et al. Role of oxidative stress and antioxidant supplementation in pregnancy disorders—. *Am J Clin Nutr* 2011;94(suppl_6):1980S-1985S.

Rakheja D, Bennett MJ, Foster BM, Domiati-Saad R, Rogers BB. Evidence for fatty acid oxidation in human placenta, and the relationship of fatty acid oxidation enzyme activities with gestational age. *Placenta* 2002 May;23(5):447-450.

Ramadan WS, Alshiraihi I, Al-karim S. Effect of maternal low protein diet during pregnancy on the fetal liver of rats. *Ann Anat* 2013 Jan;195(1):68-76.

Ramiro-Cortijo D, Herrera T, Rodriguez-Rodriguez P, Lopez De Pablo AL, De La Calle M, Lopez-Gimenez MR, et al. Maternal plasma antioxidant status in the first trimester of pregnancy and development of obstetric complications. *Placenta* 2016 Nov;47:37-45.

Ramiro-Cortijo D, Rodriguez-Rodriguez P, Lopez De Pablo AL, Lopez-Gimenez MR, González MC, Arribas SM. Fetal Undernutrition and oxidative stress: influence of sex and gender. En: Preedy VR, Patel VB (eds.). *Handbook of Famine,*

Starvation, and Nutrient Deprivation. 1^{er} Edición. Springer International Publishing AG; 2017.

Ravelli AC, van der Meulen, Jan HP, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Obesity at the age of 50 y in men and women exposed to famine prenatally-. *Am J Clin Nutr* 1999;70(5):811-816.

Regnault TR, Friedman JE, Wilkening RB, Anthony RV, Hay WW, Jr. Fetoplacental transport and utilization of amino acids in IUGR--a review. *Placenta* 2005 Apr;26 Suppl A:S52-62.

Reynolds LP, Borowicz PP, Vonnahme KA, Johnson ML, Grazul-Bilska AT, Redmer DA, et al. Placental angiogenesis in sheep models of compromised pregnancy. *J Physiol* 2005 May 15;565(Pt 1):43-58.

Rich-Edwards JW, Kleinman K, Michels KB, Stampfer MJ, Manson JE, Rexrode KM, et al. Longitudinal study of birth weight and adult body mass index in predicting risk of coronary heart disease and stroke in women. *BMJ* 2005 May 14;330(7500):1115.

Rizzo G, Arduini D. Intrauterine growth restriction: diagnosis and management. A review. *Minerva Ginecol* 2009 Oct;61(5):411-420.

Robb KP, Cotechini T, Allaire C, Sperou A, Graham CH. Inflammation-induced fetal growth restriction in rats is associated with increased placental HIF-1alpha accumulation. *PLoS One* 2017 Apr 19;12(4):e0175805.

Rodriguez-Rodriguez P, de Pablo AL, Condezo-Hoyos L, Martin-Cabrejas MA, Aguilera Y, Ruiz-Hurtado G, et al. Fetal undernutrition is associated with perinatal sex-dependent alterations in oxidative status. *J Nutr Biochem* 2015 Dec;26(12):1650-1659.

Rodríguez-Rodríguez P, de Pablo, Angel L López, García-Prieto CF, Somoza B, Quintana-Villamandos B, de Diego, José J Gómez, et al. Long term effects of fetal

undernutrition on rat heart. Role of hypertension and oxidative stress. *PloS one* 2017;12(2):e0171544.

Rodriguez-Rodriguez P, Ramiro-Cortijo D, Reyes-Hernandez CG, Lopez de Pablo AL, Gonzalez MC, Arribas SM. Implication of Oxidative Stress in Fetal Programming of Cardiovascular Disease. *Front Physiol* 2018 May 23;9:602.

Roseboom TJ, Van Der Meulen, Jan HP, Ravelli AC, Osmond C, Barker DJ, Bleker OP. Effects of prenatal exposure to the Dutch famine on adult disease in later life: an overview. *Twin Research and Human Genetics* 2001;4(5):293-298.

Rosenfeld CS. Sex-Specific Placental Responses in Fetal Development. *Endocrinology* 2015 Oct;156(10):3422-3434.

Ross MG, Beall MH. Adult sequelae of intrauterine growth restriction. *Semin Perinatol* 2008 Jun;32(3):213-218.

Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol* 2014 Jan;4(1):177-197.

Russo GL. Dietary n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids: from biochemistry to clinical implications in cardiovascular prevention. *Biochem Pharmacol* 2009 Mar 15;77(6):937-946.

Saccone G, Berghella V, Maruotti GM, Sarno L, Martinelli P. Omega-3 supplementation during pregnancy to prevent recurrent intrauterine growth restriction: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2015 Dec;46(6):659-664.

Salleh N. Diverse roles of prostaglandins in blastocyst implantation. *ScientificWorldJournal* 2014 Jan 27;2014:968141.

Scibior D, Czczot H. Catalase: structure, properties, functions. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2006;60:170-180.

Seckl JR, Cleasby M, Nyirenda MJ. Glucocorticoids, 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase, and fetal programming. *Kidney Int* 2000;57(4):1412-1417.

Seckl JR. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. *Eur J Endocrinol* 2004 Nov;151 Suppl 3:U49-62.

Sharma D, Shastri S, Farahbakhsh N, Sharma P. Intrauterine growth restriction - part 1. *J Matern Fetal Neonatal Med* 2016 Dec;29(24):3977-3987.

Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol* 1997 Mar;82(2):291-295.

Smits LJ, Elzenga HM, Gemke RJ, Hornstra G, van Eijnsden M. The association between interpregnancy interval and birth weight: what is the role of maternal polyunsaturated fatty acid status? *BMC Pregnancy Childbirth* 2013 Jan 25;13:23-2393-13-23.

Song JH, Fujimoto K, Miyazawa T. Polyunsaturated (n-3) fatty acids susceptible to peroxidation are increased in plasma and tissue lipids of rats fed docosahexaenoic acid-containing oils. *J Nutr* 2000 Dec;130(12):3028-3033.

Stacy V, De Matteo R, Brew N, Sozo F, Probyn ME, Harding R, et al. The influence of naturally occurring differences in birthweight on ventricular cardiomyocyte number in sheep. *Anat Rec (Hoboken)* 2009 Jan;292(1):29-37.

Stark MJ, Hodyl NA, Wright IM, Clifton VL. Influence of sex and glucocorticoid exposure on preterm placental pro-oxidant-antioxidant balance. *Placenta* 2011 Nov;32(11):865-870.

STATISTICS, A. B. O. (2007). year book Australia.

Stein C, Fall C, Kumaran K, Osmond C, Barker D, Cox V. Fetal growth and coronary heart disease in South India. *The Lancet* 1996;348(9037):1269-1273.

Tain Y, Chan JY, Hsu C. Maternal fructose intake affects transcriptome changes and programmed hypertension in offspring in later life. *Nutrients* 2016;8(12):757.

Tarrade A, Panchenko P, Junien C, Gabory A. Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. *J Exp Biol* 2015 Jan 1;218(Pt 1):50-58.

Tarry-Adkins JL, Martin-Gronert MS, Fernandez-Twinn DS, Hargreaves I, Alfaradhi MZ, Land JM, et al. Poor maternal nutrition followed by accelerated postnatal growth leads to alterations in DNA damage and repair, oxidative and nitrosative stress, and oxidative defense capacity in rat heart. *FASEB J* 2013 Jan;27(1):379-390.

Thompson LP, Al-Hasan Y. Impact of oxidative stress in fetal programming. *Journal of pregnancy* 2012;2012.

Tranquilli AL, Landi B, Giannubilo SR, Sibai BM. Preeclampsia: No longer solely a pregnancy disease. *Pregnancy Hypertens* 2012 Oct;2(4):350-357.

Trumbo P, Schlicker S, Yates AA, Poos M, Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine, The National Academies. Dietary reference intakes for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein and amino acids. *J Am Diet Assoc* 2002 Nov;102(11):1621-1630.

UNFPA. Factors driving adolescent pregnancy. En: Blum RW and Gates WH (eds.). *Girlhood, not motherhood: preventing adolescent pregnancy*. 1^{er} Edición. United Nations Population Fund UNFPA; 2015. p. 7-10.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(1):44-84.

Vaughan OR, Fowden AL. Placental metabolism: substrate requirements and the response to stress. *Reprod Domest Anim* 2016 Oct;51 Suppl 2:25-35.

Vega CC, Reyes-Castro LA, Rodriguez-Gonzalez GL, Bautista CJ, Vazquez-Martinez M, Larrea F, et al. Resveratrol partially prevents oxidative stress and metabolic dysfunction in pregnant rats fed a low protein diet and their offspring. *J Physiol* 2016 Mar 1;594(5):1483-1499.

Vehaskari VM, Aviles DH, Manning J. Prenatal programming of adult hypertension in the rat. *Kidney Int* 2001 Jan;59(1):238-245.

Ventura SJ, Curtin SC, Abma JC, Henshaw SK. Estimated pregnancy rates and rates of pregnancy outcomes for the United States, 1990-2008. *Natl Vital Stat Rep* 2012 Jun 20;60(7):1-21.

Vo T, Hardy DB. Molecular mechanisms underlying the fetal programming of adult disease. *J Cell Commun Signal* 2012 Aug;6(3):139-153.

von Beckerath AK, Kollmann M, Rotky-Fast C, Karpf E, Lang U, Klaritsch P. Perinatal complications and long-term neurodevelopmental outcome of infants with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2013 Feb;208(2):130.e1-130.e6.

Wadhvani N, Patil V, Joshi S. Maternal long chain polyunsaturated fatty acid status and pregnancy complications. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2018 Sep;136:143-152.

Wang Y and Zhao S. Vasculogenesis and angiogenesis of human placenta. En: Wang Y and Zhao S (eds.). *Vascular Biology of the Placenta*. 1^{er} Edición. Morgan and Claypool Life Sciences; 2010. p. 31–35.

Wu L, Feng X, He A, Ding Y, Zhou X, Xu Z. Prenatal exposure to the Great Chinese Famine and mid-age hypertension. *PloS one* 2017;12(5):e0176413.

Xu Y, Williams SJ, O'Brien D, Davidge ST. Hypoxia or nutrient restriction during pregnancy in rats leads to progressive cardiac remodeling and impairs

postischemic recovery in adult male offspring. *FASEB J* 2006 Jun;20(8):1251-1253.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 2002 Aug 1;33(3):337-349.

Zhang N, Wang W, Li W, Liu C, Chen Y, Yang Q, et al. Inhibition of 11beta-HSD2 expression by triclosan via induction of apoptosis in human placental syncytiotrophoblasts. *J Clin Endocrinol Metab* 2015 Apr;100(4):E542-9.

Zimanyi MA, Bertram JF, Black MJ. Nephron number and blood pressure in rat offspring with maternal high-protein diet. *Pediatr Nephrol* 2002 Dec;17(12):1000-1004.

Zohdi V, Lim K, Pearson JT, Black MJ. Developmental programming of cardiovascular disease following intrauterine growth restriction: findings utilising a rat model of maternal protein restriction. *Nutrients* 2014 Dec 29;7(1):119-152.

Zohdi V, Sutherland MR, Lim K, Gubhaju L, Zimanyi MA, Black MJ. Low Birth Weight due to Intrauterine Growth Restriction and/or Preterm Birth: Effects on Nephron Number and Long-Term Renal Health. *Int J Nephrol* 2012;2012:136942.