



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN VASCULAR
DE UN MODELO DE RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO
INTRA-UTERINO POR OCLUSIÓN PROGRESIVA DE
ARTERIAS UTERINAS EN COBAYAS**

René Augusto Alegría Vera

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

PROFESOR GUÍA: EMILIO AUGUSTO HERRERA VIDELA
Programa de Fisiopatología, ICBM
Facultad de Medicina, Universidad de Chile

PROFESOR COLABORADOR: BERNARDO JAVIER KRAUSE LEYTON
Centro de Investigación Médica, Facultad de Medicina
Pontificia Universidad Católica de Chile

PROYECTO FONDECYT N° 1130801

SANTIAGO, CHILE
2015



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN VASCULAR
DE UN MODELO DE RESTRICCIÓN DE CRECIMIENTO
INTRA-UTERINO POR OCLUSIÓN PROGRESIVA DE
ARTERIAS UTERINAS EN COBAYAS**

René Augusto Alegría Vera

Memoria para optar al Título Profesional
de Médico Veterinario
Departamento de Ciencias Biológicas
Animales

Nota Final.....

Prof. Guía: Dr. Emilio Herrera V. (Firma).....

Prof. Corrector: Dra. Mónica De Los Reyes S. (Firma).....

Prof. Corrector: Dr. Víctor Hugo Parraguéz G. (Firma).....

“...Dios ha puesto a los animales, junto con las otras criaturas no humanas, al servicio del hombre para que pueda, inclusive a través de ellos, lograr un desarrollo integral”

(Extracto del documento: *La prospectiva de los xenotrasplantes*, Academia Pontificia para la Vida)

A estas alturas, tiendes a apreciar quiénes son tus padres y lo que han hecho por ti. Empiezas a comprender cómo has llegado hasta este punto de tu vida y todas las cosas maravillosas en que te han influido. Empiezas a tenerlos ahí presentes. Yo estoy empezando a ver muchas cosas, por ello les dedico con mucho amor, ésta, mi obra.

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a:

Dr. Emilio Herrera V.:

Por mostrarme como un Médico Veterinario puede ser un destacado referente en la otra medicina, junto con exigirme tanto como mis sueños lo necesitaban.

Dr. Bernardo Krause L.:

Porque me enseñó que la sinceridad va recta, simple, sin dobleces, sencilla, sin ninguna segunda intención.

Dr. Marcelo Farías J.:

Por darse el tiempo de compartir con cariño sus conocimientos en Ginecología y Obstetricia. Porque Médicos Cirujanos y Médicos Veterinarios pueden trabajar en equipo en aras de un Mundo mejor para todos nuestros pacientes.

Dra. Paola Casanello T.:

Por la cálida acogida en su hogar así como en el Laboratorio de Investigación en Perinatología (U. Católica). Porque un consejo maternal nunca esta demás.

Srta. Victoria Álvarez A.:

Mi amor, por enseñarme que si encuentras a alguien que amas en la vida, entonces aférrate a ese amor.

Mis Amigos:

Porque han visto mis éxitos y derrotas en estos años, pero nunca han dudado en recordarme que se debe aspirar a más. Después que me embarqué en mis proyectos profesionales vimos perjudicado el tiempo juntos, pero nunca han dudado en recordarme que estarán para mi regreso, compartir las buenas nuevas y programar aventuras juntos.

INDICE DE CONTENIDOS

	Página
Resumen.....	III
Summary.....	IV
Introducción.....	1
Revisión Bibliográfica.....	2
Objetivo General.....	6
Objetivos Específicos.....	6
Material y Métodos.....	7
Resultados.....	11
Discusión.....	27
Conclusiones.....	34
Bibliografía.....	35
Anexos.....	41

INDICE DE FIGURAS

	Página
Fig.1 : Relación sístole/diástole (S/D) de la arteria umbilical.....	11
Fig.2 : Índice de resistencia (IR) de la arteria umbilical	12
Fig.3 : Índice de resistencia (IR) de la arteria umbilical	13
Fig.4 : Índice de pulsatilidad (IP) de la arteria umbilical.....	13
Fig.5 : Índice de pulsatilidad (IP) de la arteria umbilical.....	14
Fig.6 : Diámetro biparietal fetal (DBP).....	14
Fig.7 : Diámetro anteroposterior (DAP).....	15
Fig.8 : Altura torácica (AT).....	16
Fig.9 : Circunferencia abdominal (CA).....	16
Fig.10 : Largo de fémur (LF).....	17
Fig.11 : Peso fetal	18
Fig.12 : Peso placentario.....	18
Fig.13 : Relación peso fetal/placentario (F/P).....	18
Fig. 14 : Peso de órganos fetales.....	19
Fig.15 : Relación peso cerebro/hígado(C/H).....	20
Fig.16 : Contracción Arteria Umbilical	20
Fig.17 : Capacidad contráctil de arterias umbilicales.....	21
Fig.18 : Vasodilatación dependiente de músculo	21
Fig.19 : Respuesta vasodilatadora a SNP	22
Fig.20 : Vasodilatación dependiente de endotelio.....	22
Fig.21 : Respuesta vasodilatadora a Insulina	23
Fig.22 : Vasodilatación con Inhibidores	24
Fig.23 : Vasodilatación con Pro y Anti Oxidante	25

RESUMEN

La restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) es una causa importante de mortalidad y morbilidad perinatal. Una interacción compleja y dinámica del ambiente materno, la placenta y el feto está involucrado en asegurar el crecimiento normal del feto. Por lo tanto, un desequilibrio en este complejo sistema puede llevar a un retraso del crecimiento intrauterino y condicionar la salud en la vida posnatal del animal que padece esta condición. Esta memoria de título se ha enfocado en describir el crecimiento fetal intrauterino y la función vascular umbilical en un novedoso modelo de RCIU en cobayos. La inducción de RCIU se realizó de manera quirúrgica a través de la implantación de ocluidores ameroides que disminuyen progresivamente el flujo uterino durante la segunda mitad de la gestación. El seguimiento del crecimiento fetal y la función umbilical se realizó mediante ultrasonografía Doppler que asociado a estudios post mortem permitieron describir las características de una gestación normal y de una con marcada restricción de crecimiento (46%). Este menor peso de los fetos de término se asoció a una caída de 29% de la eficiencia placentaria. Finalmente, se observaron cambios significativos en la función vascular umbilical, tanto *in vivo* como *ex vivo*, lo que deja de manifiesto una menor función vasodilatadora en los animales RCIU. Este estudio demuestra que los fetos que presentan una disminución de la perfusión útero-placentaria tienen una marcada restricción de crecimiento asimétrica y una disfunción endotelial umbilical.

Una vez implementado este modelo, podría ser un aporte para futuros estudios que indaguen en los mecanismos de la disfunción endotelial a lo largo de la gestación y en posibles ventanas terapéuticas.

SUMMARY

Intrauterine growth restriction (IUGR) is a major cause of perinatal mortality and morbidity. A complex and dynamic interaction of maternal, placental and fetal environments is involved in ensuring normal fetal growth. Therefore, an imbalance in this complex system can lead to intrauterine growth retardation and compromise health in postnatal life. This undergraduate Thesis has focused on describing the intrauterine fetal growth and umbilical vascular function in a novel model of IUGR in guinea pigs. IUGR was surgically induced by the implantation of ameroid occluders that progressively decreased utero-placental blood flow in the second half of gestation. The fetal growth and umbilical vascular function follow-up was assessed by Doppler ultrasound technology that related to post-mortem outcomes, allowed the characterization of a normal gestation and a 46% IUGR. This decreased term fetal weight was associated with a 29 % fall in placental efficiency. Finally, there were marked changes in umbilical vascular function, both *in vivo* and *ex vivo*, evidence of a diminished vasodilator function in IUGR animals. This study indicate that fetuses with a decreased utero-placental perfusion display a marked asymmetric IUGR and endothelial dysfunction.

Once implemented this model, it could be a contribution for future studies that investigate the mechanisms of endothelial dysfunction during pregnancy and possible therapeutic windows.

INTRODUCCIÓN

La restricción de crecimiento intra-uterino (RCIU) es una condición que se define en humanos como un peso fetal por debajo del percentil diez basado en la curva de crecimiento fetal según edad gestacional (Kyle y Sankaran, 2009). Esta condición se asocia con un aumento en la morbilidad y mortalidad perinatal, existiendo además alteraciones a largo plazo en individuos nacidos con RCIU, como un mayor riesgo de desarrollar en la adultez enfermedades como síndrome metabólico e hipertensión arterial sistémica, entre otras (Gluckman *et al*, 2008). Numerosos estudios en modelos animales han centrado esfuerzos en caracterizar los efectos asociados a la RCIU sobre el riesgo de desarrollar ciertas patologías a lo largo de la vida y los mecanismos subyacentes a estos, lo que ha sido denominado como “programación durante el desarrollo de la salud y enfermedad” (Gluckman *et al*, 2008).

A pesar de que aún se desconocen con precisión los mecanismos que determinan un crecimiento fetal alterado, se ha logrado identificar como causales de la RCIU las alteraciones de la salud materna, fetal y la función placentaria (Filly *et al*, 2009). Una de las principales alteraciones que conducen a una RCIU corresponde a cambios vasculares que derivan en una menor perfusión útero-placentaria (UP), con el consecuente menor aporte de nutrientes y oxígeno (O₂) al feto. Durante la gestación se presenta un aumento considerable en los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), las cuales desempeñan un papel importante en el normal desarrollo y diferenciación de la placenta y el feto (Burton y Jauniaux, 2011). Sin embargo niveles exagerados de ROS resultan en un estrés oxidativo (EOx) asociado a daño y disfunción vascular. Es así como la mayoría de los casos de RCIU presentan un compromiso de la perfusión UP, con un aumento en marcadores de EOx a nivel placentario y fetal (Herrera *et al*, 2014). Con el fin de profundizar en la comprensión de las condicionantes de la RCIU hay un creciente interés en el desarrollo de modelos animales y así poder postular y evaluar posibles tratamientos para paliar los efectos deletéreos inmediatos, a mediano y a largo plazo en el humano. En este trabajo se propone el uso de un nuevo paradigma de RCIU mediante la oclusión progresiva de la circulación uterina en cobayas para estudiar los efectos cardiovasculares feto-placentarios. Para esto se evaluó el impacto de la reducción del flujo UP en el crecimiento fetal, el desarrollo y función placentaria/umbilical. Así mismo, se analizó si los efectos observados en la función vascular se revierten con la administración *ex vivo* del antioxidante N-Acetilcisteína.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Restricción de Crecimiento Intra-Uterino (RCIU)

En toda población existe una distribución normal del tamaño fetal (i.e. peso y talla) según edad gestacional. Se han utilizado distintos criterios para definir la RCIU en la población humana, entre los que están: a) Perímetro abdominal menor al percentil 10 ó 2,5; b) 2 Desviaciones estándares (σ) por debajo de la media para la edad gestacional; y c) Peso fetal estimado (PFE) menor que los percentiles 3, 5 y 15. Sin embargo, la definición comúnmente utilizada y más aceptada es la de un peso por debajo del percentil 10 basado en la curva de crecimiento fetal (Abdalla y Harrington, 2005; Kyle y Sankaran, 2009).

Etiología de RCIU

La restricción de crecimiento intrauterino puede ser causada por factores ambientales, maternos, placentarios y/o fetales. Entre algunos de los factores maternos que determinan el establecimiento de esta patología están la pre-eclampsia, desnutrición, hipertensión crónica y compromiso del flujo sanguíneo UP, los cuales inducen una disfunción placentaria que reduce el crecimiento fetal (Cafíci, 2003b; Filly, *et al*, 2009). El origen multifactorial de este cuadro clínico dificulta su estudio y tratamiento, por lo que se ha establecido un método de clasificación que distingue entre dos grandes causas, basándose en la simetría o asimetría del crecimiento fetal (Filly *et al*, 2009). La distinción basada en patrones de simetría procede de la idea de que las afecciones globales al feto dan lugar a una total restricción de crecimiento, manteniendo las proporciones. En contraste, las restricciones nutricionales y de O₂ originan un patrón asimétrico, particularmente después de la segunda mitad de la gestación, que tiende a preservar el desarrollo de las estructuras vitales, tales como el cerebro y corazón, en desmedro del crecimiento del resto del cuerpo, reflejado en cambios de la biometría fetal y los patrones de crecimiento intrauterino (Cafíci, 2003b; Filly, *et al*, 2009). La medición de biometría fetal se basa en determinaciones ecográficas tales como: diámetro biparietal (DBP), circunferencia abdominal (CA), longitud del fémur (LF), largo corona-cola (LCC), altura torácica (AT) y la estimación del peso corporal. De esta manera, los fetos con crecimiento asimétrico tendrían un peso corporal muy disminuido con un tamaño cefálico normal (i.e DBP normal).

Fisiopatología de RCIU

El O₂ es uno de los principales sustratos para el crecimiento y desarrollo fetal, por lo que una reducción sostenida de su concentración en sangre (hipoxemia crónica) se asocia a modificaciones perjudiciales en el desarrollo. En condiciones de hipoxia crónica, la generación de ROS aumenta, radicales que al superar la capacidad antioxidante endógena, inducen EOx (Herrera *et al*, 2014). Tanto hipoxia crónica como EOx son potentes inductores de respuestas vasculares, que al ser sostenidas en el tiempo podrían derivar en fallas cardiovasculares (Montezano y Touyz *et al*, 2014). Un efecto importante del EOx sobre el tono vascular es la disminución de la biodisponibilidad y/o de señalización del óxido nítrico (NO), un poderoso vasodilatador endógeno (Daiber *et al*, 2014). A la vez, un exceso de ROS también puede promover la proliferación, migración, inflamación y apoptosis de células vasculares (Gong y Kim, 2014). Todo lo anterior induce cambios vasculares que podrían llevar a la disfunción endotelial, en la cual hay un aumento importante de la resistencia vascular y disminución del flujo sanguíneo.

Existen diversas fuentes de ROS a nivel vascular, por ejemplo los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, la NADPH oxidasa, la eNOS desacoplada y la xantino oxidasa, entre otros (Burton y Jauniaux, 2011; Daiber *et al*, 2014). Condiciones de hipoxia y EOx pueden inducir alteraciones vasculares uterinas y umbilicales durante la gestación. Una reducción del flujo sanguíneo umbilical puede ser causada por el compromiso del flujo UP, lo que va acompañado de hallazgos histopatológicos en las placentas de fetos RCIU como reducción de la superficie vascular en las vellosidades placentarias (Baker *et al*, 2004), reduciendo el suministro adecuado de nutrientes al feto. La respuesta inicial a la disminución de la irrigación placentaria en una gestación tardía establece un patrón de crecimiento asimétrico con alteración del peso corporal del feto y un aumento en la proporción del peso cerebro/hígado (Ismail y Chang, 2012). La severidad de la disfunción vascular placentaria se puede evaluar clínicamente por ecografía Doppler color (Eco-Doppler). El eco-Doppler de las arterias uterinas evalúa la resistencia vascular y perfusión uterina, mientras que las mediciones Doppler fetal proporcionan información sobre la función cardiovascular y vascular del feto y la placenta, así como acerca de las respuestas fetales a condiciones de estrés como son hipoxia y desnutrición (Mari y Picconi, 2008). La función vascular depende en gran medida del endotelio, monocapa de la túnica íntima vascular capaz de responder a estímulos físicos y químicos, aportando gran parte de las señales vasodilatadoras.

Esto se consigue mediante la producción y liberación de varias moléculas vasoactivas como óxido nítrico (NO), Prostaciclina (PGI₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), entre otros (Daiber *et al*, 2014; Herrera *et al*, 2014). Se sabe que la RCIU induce alteraciones vasculares con disfunción endotelial en arteria umbilical y algunos territorios fetales, los cuales podrían estar mediados por una disminuida función óxido nítrica (Giussani *et al*, 2012). Además, la persistencia de la disfunción endotelial deriva en aumento de resistencia vascular, remodelamiento vascular y disminuida perfusión de órganos (Daiber *et al*, 2014; Herrera *et al*, 2014; Gong y Kim, 2014).

Consecuencias en la salud feto-neonatal de RCIU

Como se indicó previamente, un crecimiento fetal restringido se asocia a compromisos en la salud del individuo a corto, mediano y largo plazo. Inicialmente, existen consecuencias en el sistema cardiovascular fetal y/o neonatal que resultan de las adaptaciones a la hipoxia crónica, en el cual aumenta la presión arterial sistémica y la postcarga cardíaca, con una consecuente hipertrofia ventricular izquierda (Bahtiyar y Copel, 2008). Esto se asocia con una disminución de la fracción del gasto cardíaco combinado fetal, que transita en la placenta; lo que conduce a un aumento en la recirculación de la sangre desoxigenada dentro del cuerpo fetal, manteniendo una hipoxia fetal crónica (Pardi *et al*, 2002, Ismail y Chang, 2012). Una información relevante que permite discriminar una restricción de crecimiento fetal de un feto pequeño pero constitutivamente sano, es el aumento de la resistencia vascular placentaria, lo cual es frecuente en gestaciones RCIU asociado a insuficiencia placentaria (Mari y Picconi, 2008). Lo anterior no sólo impacta en el crecimiento fetal, sino que aumenta la morbilidad/mortalidad fetal y neonatal. Entre las causas de muerte perinatal se encuentra la acidosis fetal, edema cerebral severo, cardiomiopatía dilatada y shock, entre otras. (Abdalla y Harrington, 2005; Kyle y Sankaran, 2009). Esta condición se asocia además con alteraciones a largo plazo en individuos nacidos con RCIU, como un mayor riesgo de desarrollar en la adultez enfermedades como síndrome metabólico, enfermedad coronaria, hipertensión arterial sistémica, entre otras (Gluckman *et al*, 2008).

La cobaya - Modelo de estudio RCIU

La interrupción del flujo sanguíneo uterino al lecho placentario ha sido el método más frecuentemente utilizado en modelos experimentales animales para inducir RCIU (Taylor y Lee, 2012). Uno de las técnicas utilizados es la ligadura de arteria uterina en cobayos (*Cavia porcellus*) como forma de causar restricción de crecimiento con patrón asimétrico. El modelo de cobayas gestantes representa un buen paradigma de disfunción vascular asociada a RCIU secundaria a una insuficiencia placentaria (Turner y Trudinger, 2009). Esta especie comparte muchos rasgos reproductivos con los seres humanos, por ejemplo tienen una estructura placentaria (discoidal hemo-monocorial), patrones de invasión del trofoblasto, distribución de la vasculatura uterina y maduración cardiovascular similares al de la especie humana (Dyson *et al*, 2014). Adicionalmente, el largo de la gestación (65-70 días) permite desarrollar un grupo experimental en un tiempo relativamente breve y evaluar los efectos inmediatos y a largo plazo.

A pesar de lograr una RCIU considerable (70% del peso fetal), el modelo de ligadura de arteria uterina tiene un enfoque de todo o nada, donde el flujo uterino es anulado agudamente durante un procedimiento quirúrgico, presentado una alta tasa de pérdidas fetales por aborto. Con el fin de disminuir el porcentaje de aborto postoperatorio, Turner y Trudinger (2009) modificaron la técnica quirúrgica con diatermia de la mitad de las ramas de la arteria uterina que irrigan cada placenta. A pesar de que la técnica implementada por aquel grupo mejoró la sobrevivencia fetal de 22% a 53%, no pudo evitar la totalidad de los abortos (Turner y Trudinger, 2009). Es por esto, que un grupo de investigadores en una colaboración entre la Pontificia Universidad Católica de Chile y la Universidad de Chile, decidieron implementar una mejora en este modelo de RCIU a través de la oclusión progresiva de las arterias uterinas y así disminuir las pérdidas postoperatorias (Alegría *et al*, 2014).

La presente memoria de título pretende caracterizar este novedoso modelo de RCIU en cobayas donde se induce la reducción progresiva y estable del flujo sanguíneo uterino a través de la implantación de un anillo constrictor ameroide (AA), el que asegura una baja mortalidad fetal con un nivel importante de RCIU.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el crecimiento fetal y la función vascular umbilical en un modelo de restricción de crecimiento intra-uterino, a través de la implantación quirúrgica de ocluidores en las arterias uterinas de cobayas gestantes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

En cobayas gestantes, con (RCIU) y sin (Control) ocluidores en arterias uterinas, determinar:

1. Las variables de biometría fetal (DBP, DAP, AT, CA y LF) mediante ultrasonografía, semanalmente, durante la segunda mitad de la gestación.
2. Las variables de velocimetría (Índice de Pulsatilidad, Índice de Resistencia y relación Sístole/Diástole) de la arteria umbilical mediante eco-Doppler, semanalmente, durante la segunda mitad de la gestación.
3. La función vascular umbilical ex vivo (vasoconstrictora y vasodilatadora) del feto de término, mediante miografía de alambre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

En este estudio se utilizaron 14 cobayas preñadas, las que se dividieron en 2 grupos: control sin RCIU (Control, $n_{\text{materno}}=10$) y RCIU (RCIU, $n_{\text{materno}}=4$), además de 4 machos adultos para las cruces. Todos los animales fueron mantenidos y experimentados en el Bioterio de Cobayos de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Todos los manejos y procedimientos experimentales con animales contaron con la aprobación del protocolo de bioética CBA#0694, de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile además del permiso incluido en el proyecto Fondecyt n° 1130801.

Antecedentes de los Animales de Laboratorio

- Especie(s) utilizada(s): Cobayos (*Cavia porcellus*), cepa Pirbright White.
- Edad/Estado de desarrollo: Fetos y adultos jóvenes (<6 meses).
- Peso: 60-100 g (fetos) – 600-800 g (adultos).
- Sexo: Ambos
- Lugar de obtención de los animales: Instituto de Salud Pública (ISP).
- Lugar de mantención: Bioterio de la Facultad de Medicina Oriente, Universidad de Chile.
- Lugar de procedimientos *in vivo*: Bioterio de la Facultad de Medicina Oriente, Universidad de Chile.
- Lugar de procedimientos *ex vivo*: Laboratorio de Función y Reactividad Vascular, ICBM, Universidad de Chile; Laboratorio de Investigación en Perinatología, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Manejo de los Animales

Los animales se trasladaron desde su lugar de adquisición (ISP) en jaulas transportadoras hasta el bioterio de la Facultad de Medicina Oriente, Universidad de Chile. En este bioterio se mantiene un ambiente controlado (T° 20-25 °C, HR 50-60%, Luz/Oscuridad 12:12) y jaulas individuales que permiten la interacción visual de los ejemplares. Los animales se alimentaron con una dieta comercial (LabDiet 5025, Guinea Pigs, 20-30 grs/día) junto con heno de alfalfa, y agua de bebida *ad libitum*. Las hembras fueron examinadas diariamente durante su ciclo estral de 16 días. Al ser pesquisado el estro (apertura vaginal), la hembra se mantuvo con un macho previamente probado durante dos días o hasta el cierre genital de la hembra. Todas las cobayas gestantes se mantuvieron en jaulas individuales. Luego de confirmar gestación entre los 20-25 días por ecografía, la cobaya gestante entró a uno de los 2 grupos.

A los 35 días de gestación, todas las cobayas fueron sometidas a una cirugía: el grupo control a una falsa (*Sham-control*) y el grupo RCIU a una cirugía con implantación de oclusores ameroides (AA) en ambas arterias uterinas (RCIU). Los AA consisten en un anillo interno de caseína comprimida y endurecida con formalina (ameroide) y otro exterior de acero inoxidable que se implantan alrededor de la arteria. Posterior a la instalación quirúrgica, el ameroide se hidrata lentamente y se expande. El anillo de acero impide la expansión centrífuga del ameroide y, por lo tanto, el diámetro del lumen cilíndrico central se reduce gradualmente, permitiendo una oclusión progresiva del flujo sanguíneo del vaso en cuestión (Leshem *et al*, 2008). La oclusión completa del vaso sanguíneo se logra a los 10-14 días post instalación.

Procedimientos

A. Inducción de RCIU

Las cobayas preñadas fueron sometidas a cirugía aséptica bajo anestesia general (ketamina 60 mg/kg, xilacina 4 mg/kg y atropina 0,1 mg/kg IM) y tratamiento analgésico (carprofeno 4 mg/kg SC) y antibiótico profiláctico (oxitetraciclina 20 mg/kg SC) al día 35 de la gestación. Una vez logrado un plano anestésico profundo, se realizó una laparotomía media infra-umbilical, exponiéndose el útero grávido. Los AA (COR-2.00-SS, Research Instruments NW, Inc, EEUU) fueron implantados bilateralmente en las arterias uterinas. Posteriormente, la pared abdominal y piel fueron suturadas por capas con sutura absorbible (Vicryl 4/0, Ethicon, EEUU). Finalmente se instalaron grapas quirúrgicas (Auto Suture™, Condivien, Rep. Dominicana) en la piel. El monitoreo post operatorio se realizó mediante examen físico diario de todos los animales y las grapas de piel se retiraron a los 7-8 días postoperatorios. Los grupos controles se sometieron al mismo procedimiento quirúrgico pero sin implantación de AA (*sham operated*).

B. Evaluación *in vivo*

Todos los exámenes y evaluaciones *in vivo* fueron realizados con la cobaya consciente e inmovilizada mediante contención manual por un operador experimentado.

Eco-Doppler durante la gestación

A partir del día 25 de gestación se obtuvieron dos veces por semana los siguientes índices: relación sístole/diástole (S/D), compuesto por la velocidad sistólica máxima (VSM) y la velocidad diastólica final (VDF), índice de resistencia (IR) o índice de Pourcelot y el índice de pulsatilidad (IP) o índice de Goslin, de la arteria umbilical por medición eco-Doppler (SonoVet R3, Samsung Medison) junto a un transductor de 5-12 MHz

(modelo TZLN5-12, Samsung Medison) . La fórmula del IR se puede descomponer en $(VSM-VDF)/VSM$ que puede tomar como valor 1 el máximo teórico. La fórmula del IP se define como $(VSM-VDM)/VMC$, donde VDM es la velocidad diastólica mínima y VMC, la velocidad media del ciclo. A diferencia de lo descrito para IR, este índice no tiene un valor máximo, pudiendo ser infinito cuando las velocidades diastólicas son escasas o nulas. Ambos índices (IR e IP) reflejan resistencia al flujo producido por el lecho micro vascular distal al sitio de medición.

Biometría fetal durante la gestación

A partir del día 20-25 post monta se comenzaron los registros de la biometría en las cobayas gestantes. Para cada feto, se determinó diámetro biparietal (DBP), altura torácica (AT), circunferencia abdominal (CA), diámetro antero-posterior (DAP) y largo femoral (LF), dos veces a la semana.

Eutanasia a término

Al término de la gestación (60-62 d) y previo al parto, las cobayas y sus fetos fueron eutanasiados por sobredosis anestésica (Tiopental Sódico, 200 mg/kg IP, Opet, Laboratorio Chile). Esta anestesia traspasa la barrera placentaria por lo que induce una anestesia profunda materna y fetal previa a la muerte. Una vez confirmado el paro cardio-respiratorio, se extrajeron los fetos y sus placentas, los cuales fueron disecados, sus órganos pesados y muestras de tejidos conservadas.

Reactividad Vascular umbilical

A la disección, se obtuvieron rápidamente segmentos de arterias umbilicales, las cuales fueron mantenidas en PBS a 4°C. Las respuestas vasoactivas de las arterias umbilicales fueron caracterizadas mediante “miografía de alambre” (Giussani *et al* 2012; Krause *et al*, 2012). Brevemente, segmentos de entre 2 a 3 mm de largo de arterias fueron disecados bajo lupa (aumento 10X) con el fin de liberar todo el tejido conectivo posible. Los anillos vasculares fueron montados en un miógrafo de alambre (Multiwire Myograph System 610M, DMT) y mantenidos a 37°C con burbujeo constante de aire/CO₂ (95/5) en tampón Krebs (NaCl 118.5 mM, NaHCO₃ 25 mM, KCl 4.7mM, CaCl₂ 2.5 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM y D-glucosa 5.5 mM). Luego de 30 minutos en reposo, se determinó el diámetro óptimo de cada segmento mediante el método de tensión activa generada por despolarización con Krebs-KCl 62,5 mM, para lo cual se reemplaza parcialmente el Na⁺ por K⁺, sin alterar la osmolaridad de la solución.

Este método determina la tensión activa en respuesta a KCl (62,5 mM) a diámetros crecientes, hasta el estado donde una mayor apertura del segmento no incrementa la fuerza en respuesta al estímulo, siendo el diámetro óptimo aquel donde el agente constrictor genera la mayor respuesta (Ward *et al*, 2004). Una vez determinado el diámetro óptimo, se dejaron reposar los anillos montados durante al menos 30 min. En vasos pre-contraídos con KCl 37,5 mM se determinó la respuesta farmacológica al agonista vasodilatador dependiente de NO, insulina (10^{-12} a 10^{-8} M) para arterias umbilicales en condiciones basales y en vasos pre-incubados (30 min) con el inhibidor de las NOS L-N^G-Nitroarginina (L-NAME, 10^{-4} M); con el inhibidor de la actividad de arginasas, S-(2-boronoetil)-L-Cisteína-HCl (BEC 10^{-5} M); en presencia del antioxidante N-acetil cisteína (NAC 10^{-5} M) y un pro oxidante, 3-Morfolinosidnona Imina (SIN-1). Luego de cada experimento, las arterias se lavaron 5 veces con Krebs y se dejaron reposar por 30 minutos antes de la siguiente condición experimental. Adicionalmente se analizó la relajación en respuesta a NO independiente del endotelio, mediante la estimulación de arterias pre-contraídas con el dador de NO, nitroprusiato de sodio (SNP, 10^{-11} a 10^{-5} M). Las tensiones registradas fueron expresadas como porcentaje de relajación (obteniendo el 0 por KCl en cada condición antes de agregar el estímulo vasodilatador), y las curvas concentración-respuesta se ajustaron a una función sigmoidea utilizando el programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, USA). De los ajustes se derivaron los valores de respuesta máxima (Rmax) y la concentración necesaria para obtener el efecto máximo medio (EC₅₀) también representado como pD₂ (-logEC₅₀).

Análisis Estadístico

Las regresiones y funciones de los datos ecográficos, doppler y de la reactividad vascular fueron generadas y analizadas mediante GraphPad Prism 6.0. La prueba Shapiro–Wilk se utilizó a fin de determinar la presencia de una distribución normal de datos en cada grupo. Dependiendo de este resultado, los valores de pesos fetales y relaciones biométricas entre cada grupo fueron comparados mediante la prueba paramétrica (t de Student) o no paramétrica (Mann-Whitney). Para las curvas de concentración-respuesta derivadas de los experimentos de miografía, el análisis de la respuesta máxima y pD₂ a los distintos agentes farmacológicos así como de los valores eco-Doppler fue realizado mediante una prueba ANOVA de 1 y 2 vías, según corresponda. En el caso de las regresiones se utilizó la prueba ANCOVA y se consideraron diferencias significativas cuando $p \leq 0,05$.

RESULTADOS

Eco-Doppler Umbilical

Relación sístole/diástole (S/D)

El análisis de la sonografía Doppler muestra que en el primer tramo de datos analizados (25-34 días) denominado rango pre quirúrgico, no existen diferencias significativas entre ambos grupos. Posterior a la intervención, en el tramo post intervención quirúrgica inmediato (35-39 días) y el rango post quirúrgico temprano (40-44), el grupo RCIU posee una elevación de ~35% del S/D promedio respecto del Control ($p < 0,01$). El grupo RCIU aumenta progresivamente la S/D hasta llegar a un nivel máximo en el rango de 45-49 días ($p < 0,001$, vs control). En los últimos dos tramos (50-54, 55-60), se mantiene el aumento significativo ($p < 0,01$) para el grupo RCIU respecto del control (Figura 1).

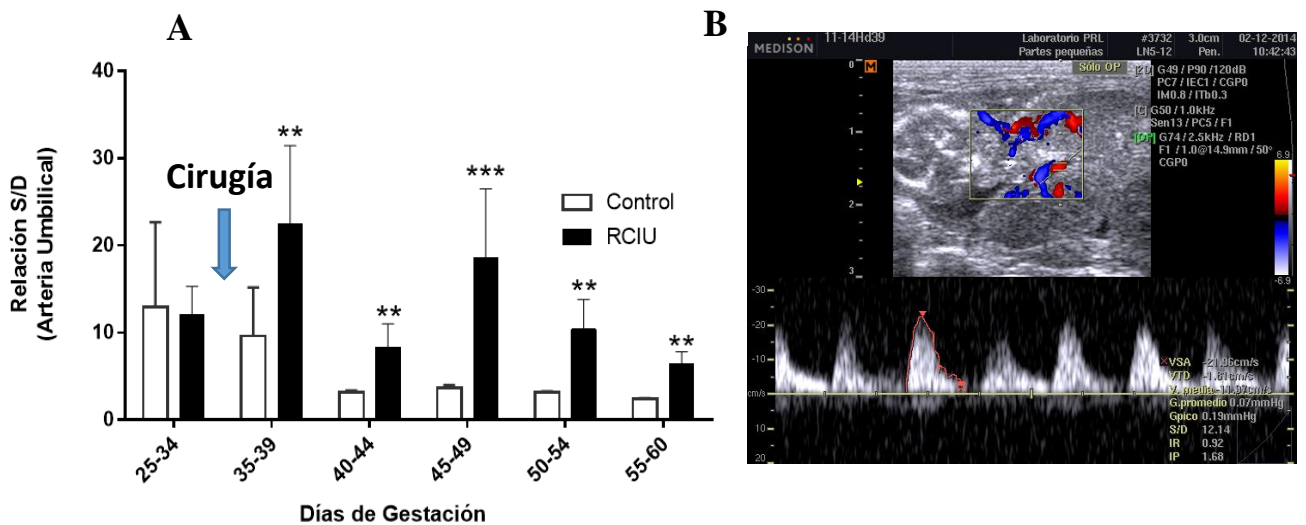


Figura 1. Relación sístole/diástole (S/D) de la arteria umbilical. (A) Se muestra la S/D en intervalos de 5 días a lo largo de la gestación en cobayas controles (barras blancas, $n_{\text{fetal}}=10$) y RCIU (barras negras, $n_{\text{fetal}}=8$). Diferencias significativas (vs control): ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. (B) Medición de S/D desde la velocimetría de arteria umbilical.

Índice de Resistencia (IR)

Previo a la intervención quirúrgica, los índices de resistencia umbilicales fueron similares entre ambos grupos. En cambio, el grupo RCIU presenta un mayor valor de IR que los controles en los tramos post quirúrgicos. IR resalta sus diferencias con respecto al grupo Control en el trecho 40-44 y 45-49 de manera significativa ($p \leq 0.001$ y $p \leq 0.01$, respectivamente), el cual se mantiene en el tramo terminal de la gestación (Figura 2).

En el último rango de medición, destaca que ambos grupos presentaron los valores más bajos de IR durante la gestación, que llevados a números estaría representado por una reducción del 43.83 % y 31,43% para el grupo Control y RCIU, respectivamente (Figura 2). Al ajustar el IR a lo largo de la gestación a una regresión lineal, se obtienen diferencias significativas en la trayectoria de las curvas entre grupos con un cambio en la pendiente (Figura 3).

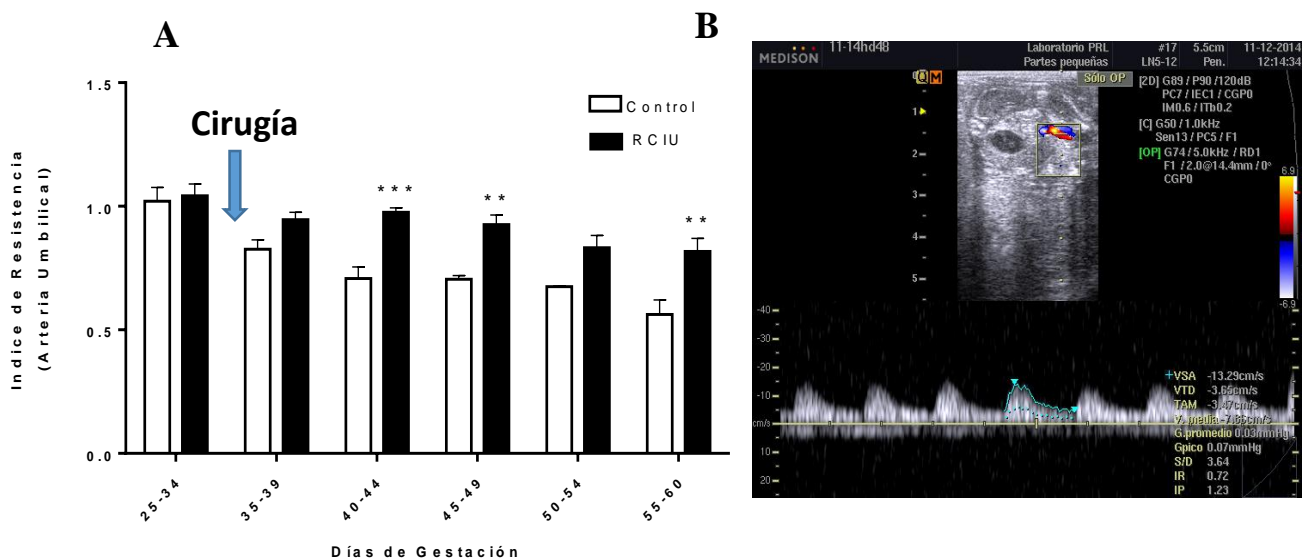


Figura 2. Índice de resistencia (IR) de la arteria umbilical. (A) Se muestra la IR en intervalos de 5 días a lo largo de la gestación en cobayas controles (barras blancas, $n_{\text{fetal}}=10$) y RCIU (barras negras, $n_{\text{fetal}}=8$). Diferencias significativas (vs control): * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$. (B) Medición de IR desde la velocimetría de la arteria umbilical.

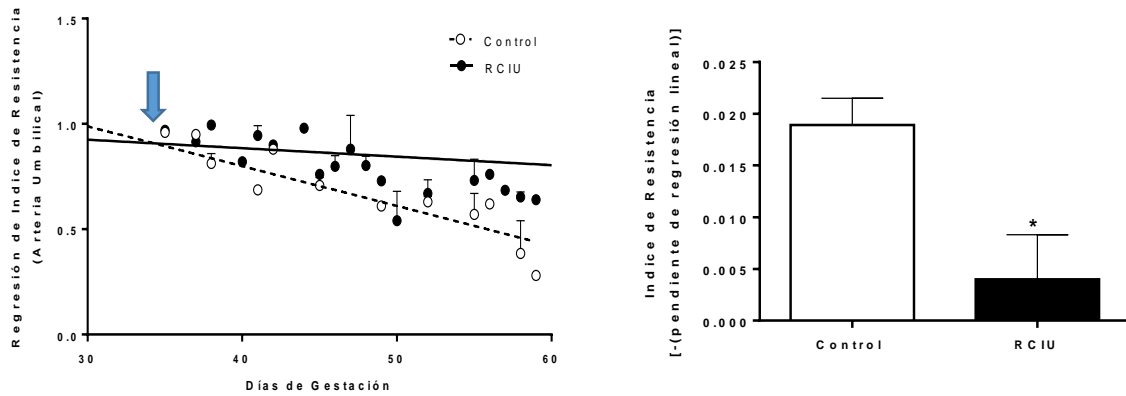


Figura 3. Índice de resistencia (IR) de la arteria umbilical. Se muestra la IR en una regresión lineal a lo largo de la gestación (A) y la pendiente generada por la regresión lineal (B) en cobayas controles (círculos blancos y línea discontinua, $n_{\text{fetal}}=10$) y RCIU (círculos negros y línea continua, $n_{\text{fetal}}=8$). Diferencias significativas (vs control): * $p \leq 0,05$.

Índice de Pulsatilidad (IP)

En el periodo inicial, previo a la intervención quirúrgica, ambos grupos muestran un IP similar. En cambio, los individuos del grupo RCIU alcanzan el pico de IP en el periodo 40-44 días, siendo significativa ($p \leq 0.001$) respecto al grupo control, diferencias que se mantienen hasta el término de la gestación (Figura 4). Al ajustar la IP a lo largo de la gestación a una regresión lineal, se obtienen diferencias significativas en la trayectoria de las curvas entre grupos con un aumento significativo en la pendiente del grupo RCIU (Figura 5).

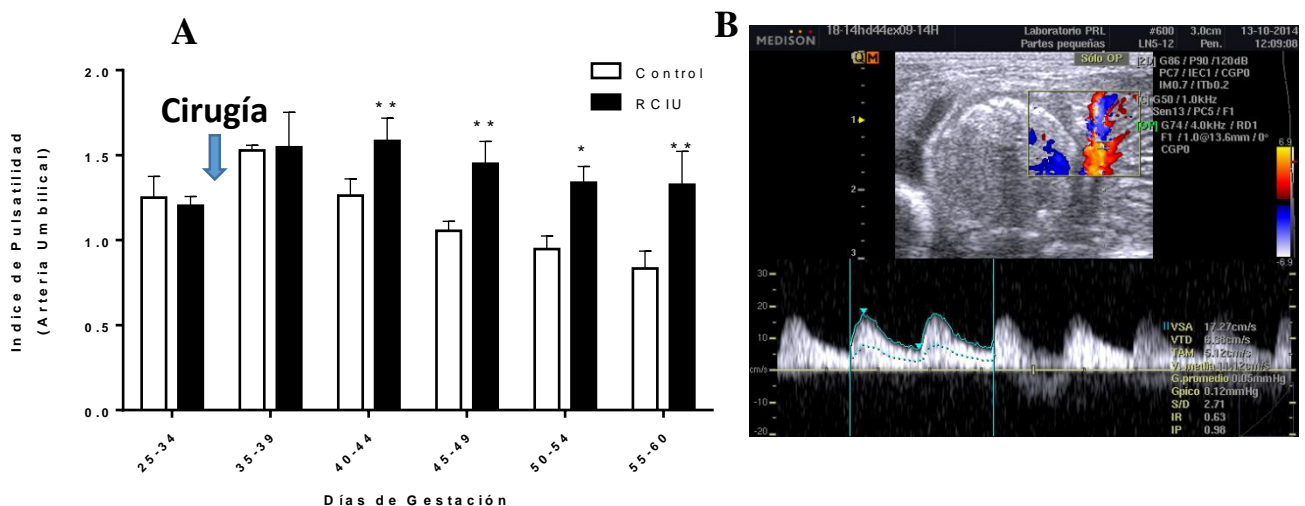


Figura 4. Índice de pulsatilidad (IP) de la arteria umbilical. (A) Se muestra la IP en intervalos de 5 días a lo largo de la gestación en cobayas controles (barras blancas, $n_{\text{fetal}}=10$) y RCIU (barras negras, $n_{\text{fetal}}=8$). Diferencias significativas (vs control): * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$. (B) Medición de IP en la velocimetría de la arteria umbilical.

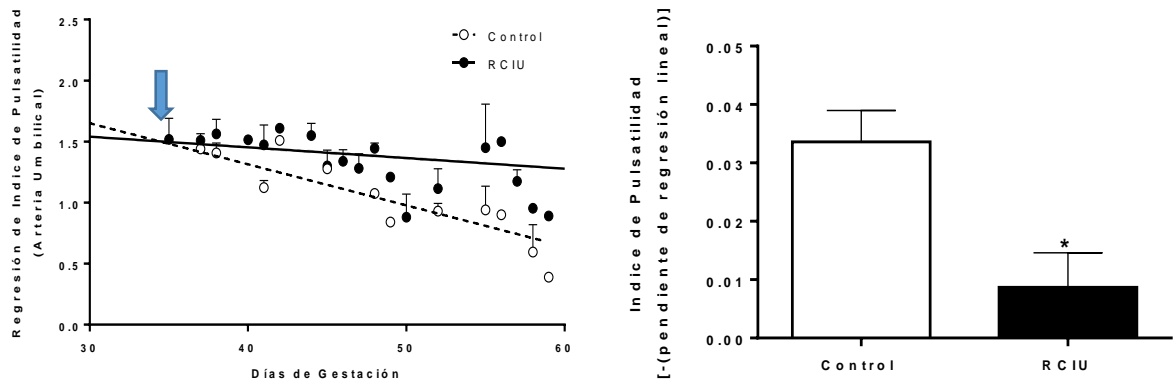


Figura 5. Índice de pulsatilidad (IP) de la arteria umbilical. Se muestra la IP en una regresión lineal (A) y la pendiente generada (B) a lo largo de la gestación en cobayas controles (círculos blancos y línea discontinua, $n_{\text{fetal}}=10$) y RCIU (círculos negros y línea continua, $n_{\text{fetal}}=8$). Diferencias significativas (vs control): * $p \leq 0,05$.

Biometría Fetal

Todas las variables de biometría fetal determinadas durante este estudio fueron similares entre grupos experimentales previo a la intervención quirúrgica (días 25-34 de gestación).

Diámetro biparietal (DBP)

Posterior a la cirugía, hubo una disminución en la tasa de crecimiento del DBP. Al ajustar la curva de crecimiento del DBP a una correlación lineal, se desprende un $r = 0.9736$ y $r = 0.9711$ para el grupo control y RCIU, respectivamente (Figura 6).

Al comparar las funciones generadas por el grupo Control ($Y=0.03871 \cdot X-0.322$) y RCIU ($Y=0.03560 \cdot X-0.2227$) se obtuvo que sus pendientes no eran distintas.

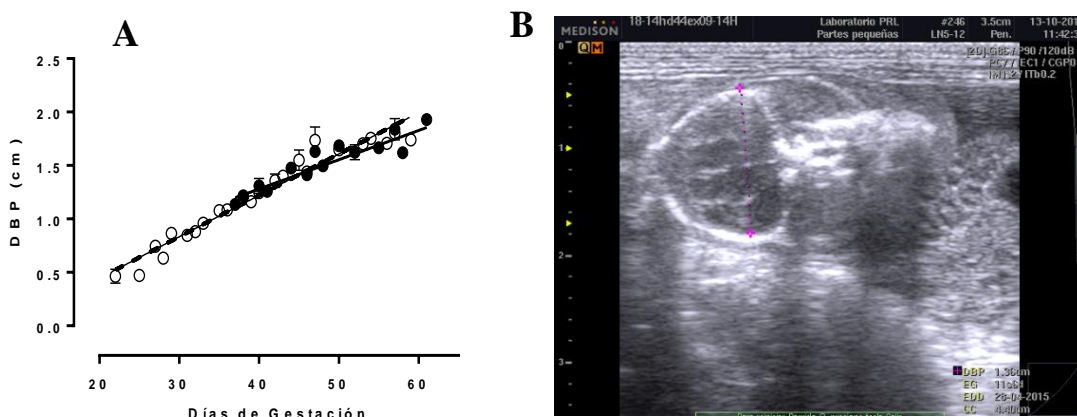


Figura 6. Diámetro biparietal fetal (DBP). (A) Se muestra la DBP en el rango de 25 a 60 días de gestación en cobayas controles (círculos blancos, línea discontinua, $n_{\text{fetal}}=10$) y RCIU (círculos negros, línea continua, $n_{\text{fetal}}=8$). (B) Medición de DBP en cráneo fetal.

Diámetro antero-posterior (DAP)

Al ajustar la curva de crecimiento del DAP a una correlación lineal, se desprende un $r_{\text{Control}} = 0.9881$ y $r_{\text{RCIU}} = 0.9814$, con $Y_{\text{Control}} = 0.08110 * X - 1.459$ y $Y_{\text{RCIU}} = 0.06769 * X - 1.049$ como respectivas funciones. Las pendientes obtenidas de las funciones, demuestran una caída significativa del grupo RCIU vs. Control ($p \leq 0.05$) (Figura 7).

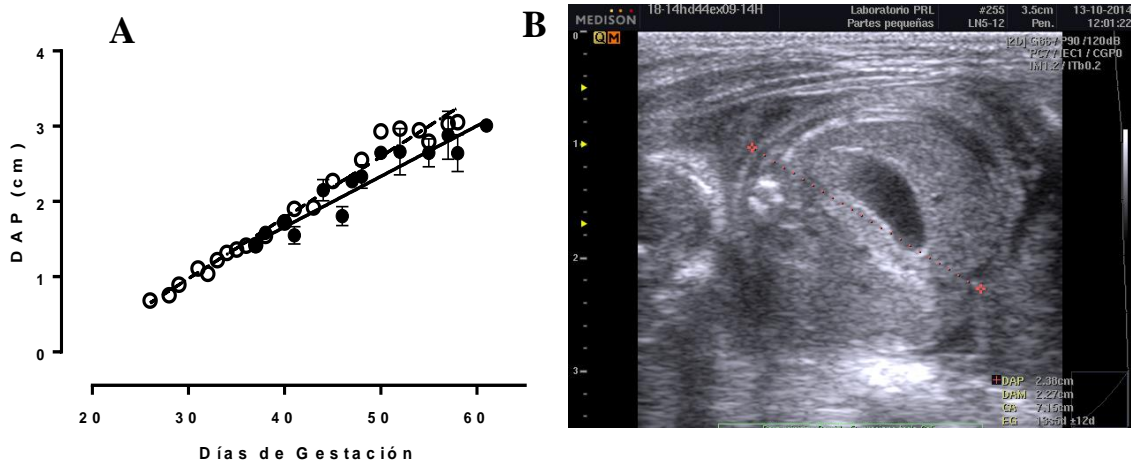


Figura 7. Diámetro anteroposterior (DAP). (A) Se muestra la DAP en el rango de 25 a 60 días de gestación en cobayas control (círculos blancos, línea discontinua, $n_{\text{fetal}}=10$) y RCIU (círculos negros, línea continua, $n_{\text{fetal}}=8$). (B) Medición de DAP en corte transversal abdomen fetal.

Altura torácica (AT)

Del seguimiento de la AT a lo largo de la gestación, se desprenden correlaciones de $r_{\text{Control}} = 0.9789$ y $r_{\text{RCIU}} = 0.9453$, con las funciones respectivas $Y_{\text{Control}} = 0.06544 * X - 0.9063$ y $Y_{\text{RCIU}} = 0.05161 * X - 0.4907$. Al comparar las pendientes, RCIU presenta una caída significativa respecto al grupo control ($p \leq 0.05$) (Figura 8).

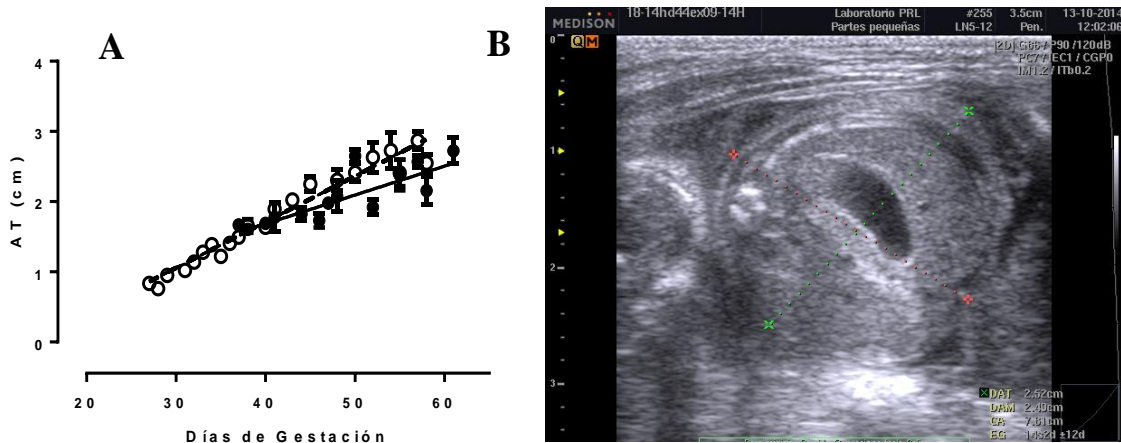


Figura 8. Altura torácica (AT). (A) Se muestra la AT en el rango de 25 a 60 días de gestación en cobayas control (círculos blancos, línea discontinua, $n_{fetal}=10$) y RCIU (círculos negros, línea discontinua, $n_{fetal}=8$). (B) Medición de AT en corte transversal de abdomen fetal.

Circunferencia abdominal (CA)

El ajuste del seguimiento de la CA a lo largo de la gestación, dio correlaciones de $r_{Control}= 0.9821$ y $r_{RCIU}= 0.9763$, con las siguientes funciones lineales: $Y_{Control}=0.2392*X-4.145$ y $Y_{RCIU}=0.1845*X-2.643$.

Al análisis estadístico, las pendientes para ambos grupos fueron considerados significativamente distintos ($p \leq 0.01$) de (Figura 9).

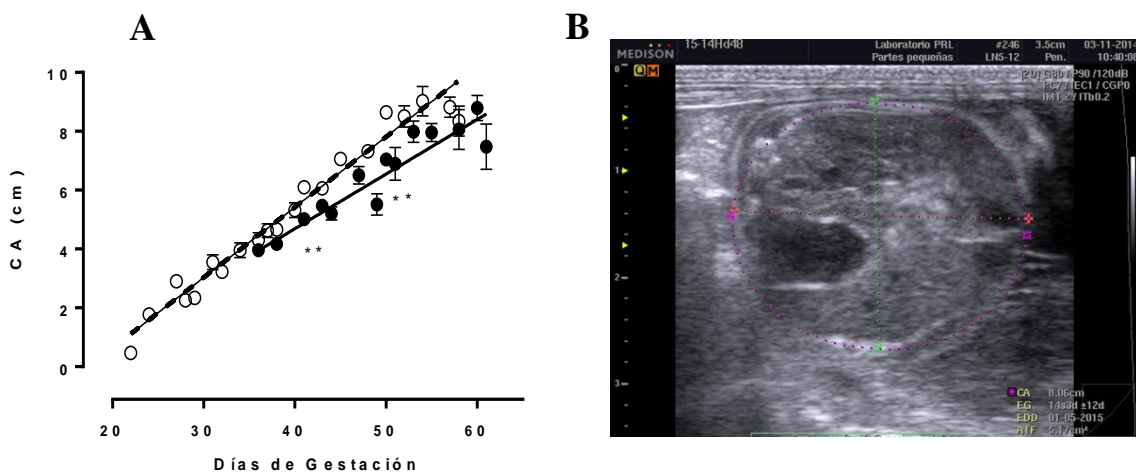


Figura 9. Circunferencia abdominal (CA). (A) Se muestra la CA en el rango de 22 a 60 días de gestación en cobayas controles (círculos blancos, línea discontinua, $n_{fetal}=10$) y RCIU (círculos negros, línea discontinua, $n_{fetal}=8$). Diferencias significativas ($p \leq 0,01$): ** vs control. (B) Medición de la CA en corte trasversal del abdomen fetal

Longitud femoral (LF)

El ajuste lineal de LF a lo largo de la gestación posee un $r_{\text{Control}}= 0.9786$ y $r_{\text{RCIU}}= 0.9787$, con las funciones $Y_{\text{Control}}=0.05715*X-1.651$ y $Y_{\text{RCIU}}=0.04748*X-1.335$, respectivamente. Además de una diferencia significativa ($p \leq 0.01$) de las pendientes para ambos grupos (Figura 10).

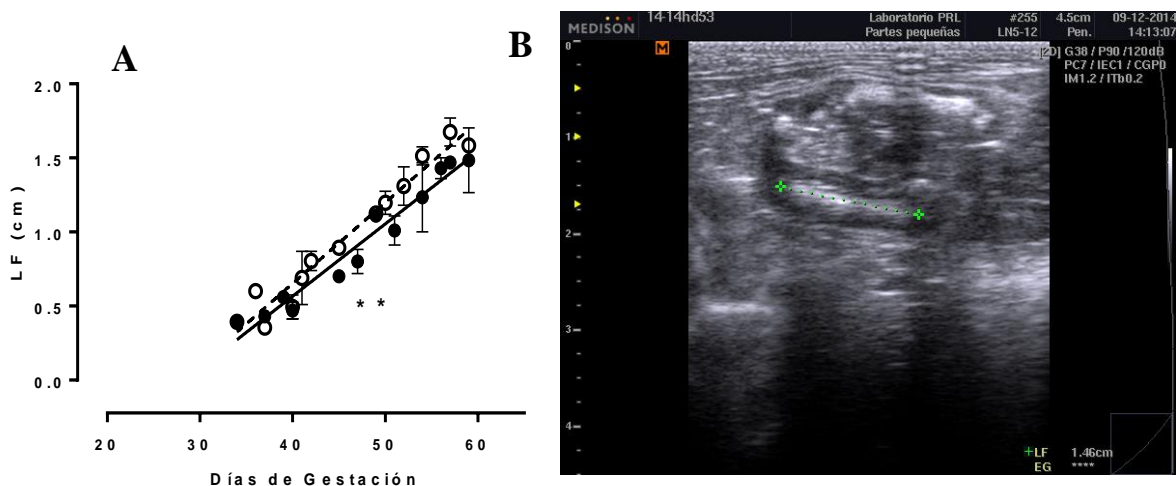


Figura 10. Largo de fémur (LF). (A) Se muestra la LF en el rango de 32 a 60 días de gestación en cobayas control (círculos blancos, línea discontinua, $n_{\text{fetal}}=10$) y RCIU (círculos negros, línea continua, $n_{\text{fetal}}=8$). Diferencias significativas ($p \leq 0,01$): ** vs control. (B) Medición de LF en un corte transversal de la última sección lumbar del feto.

Peso corporal y de órganos en los fetos de término

Peso corporal fetal y placentario

El peso promedio para el grupo Control vs. grupo RCIU obtuvo una diferencia del 46% del peso corporal ($p \leq 0.001$) (Figura 11).

La diferencia del peso placentario promedio para grupo Control vs. grupo RCIU corresponde al 40% ($p \leq 0.001$) (Figura 12). Al calcular la razón del peso fetal/peso placentario, como índice de eficiencia placentaria, se obtiene una diferencia de 29% en la eficiencia placentaria de los RCIU ($p \leq 0.001$ vs control) (Figura 13).

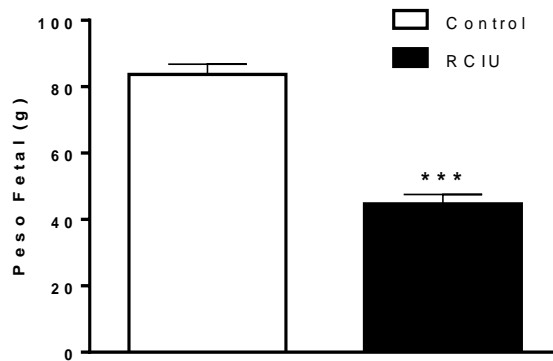


Figura 11. Peso fetal. Se muestra el peso fetal a término en cobayas control (barras blancas, $n_{fetal}=16$) y RCIU (barras negras, $n_{fetal}=8$). Diferencias significativas (vs control): *** $p \leq 0,001$.

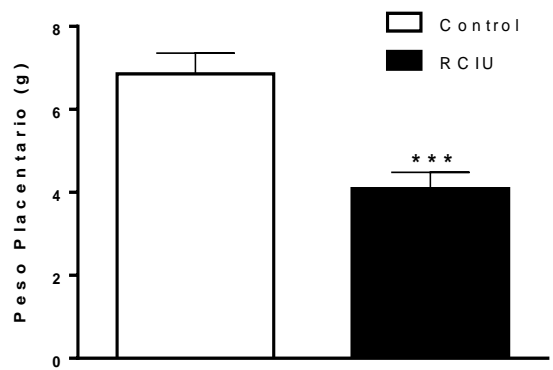


Figura 12. Peso placentario. Se muestra el peso placentario de los feto a término en cobayas controles (barras blancas, $n_{fetal}=16$) y RCIU (barras negras, $n_{fetal}=8$). Diferencias significativas (vs control): *** $p \leq 0,001$.

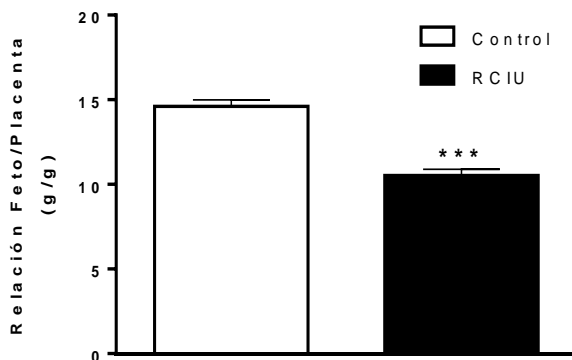


Figura 13. Relación peso fetal/placentario (F/P). Se muestra la relación del peso fetal a término y sus placentas en cobayas controles (barras blancas, $n_{fetal}=10$) y RCIU (barras negras, $n_{fetal}=8$). Diferencias significativas (vs control): *** $p \leq 0,001$.

Peso de órganos fetales

El peso del cerebro fetal fue similar entre grupos. En contraste, el pulmón presentó un peso promedio del 43,8% menor para el grupo RCIU vs Control, considerado significativo ($p \leq 0.001$).

De igual manera, el peso promedio del hígado para el grupo RCIU, presentó una diferencia del 58,28% respecto del Control. ($p \leq 0.001$).

De manera consistente, el corazón de los RCIU también presentó una diferencia en su peso, lo cual representa una diferencia del 52,29% respecto de Control ($p \leq 0.001$). El peso de ambos riñones también presentó una diferencia significativa en el grupo RCIU de 50,57% vs. Control ($p \leq 0.001$). En contraste, el bazo presentó pesos similares ($p = 0.92$) entre grupo Control y RCIU (Figura 14).

Para obtener el tipo de crecimiento predominante en cada grupo, se obtuvo la relación cerebro/hígado, que indica el grado de simetría en el crecimiento corporal fetal. Para el grupo RCIU se calculó un aumento del 209,56% ($p \leq 0.001$) respecto del grupo Control, interpretado como un patrón asimétrico del crecimiento (Figura 15).

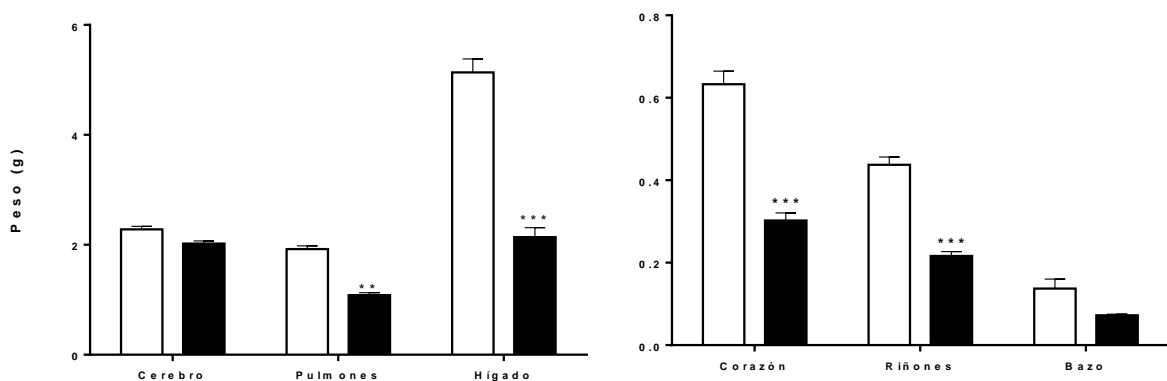


Figura 14. Peso de órganos fetales. Se muestra el peso de cerebro, pulmón e hígado (A) y corazón, riñones y bazo (B) del grupo control (barras blancas, $n_{\text{fetal}}=10$) y RCIU (barras negras, $n_{\text{fetal}}=8$). Diferencias significativas (vs control): ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

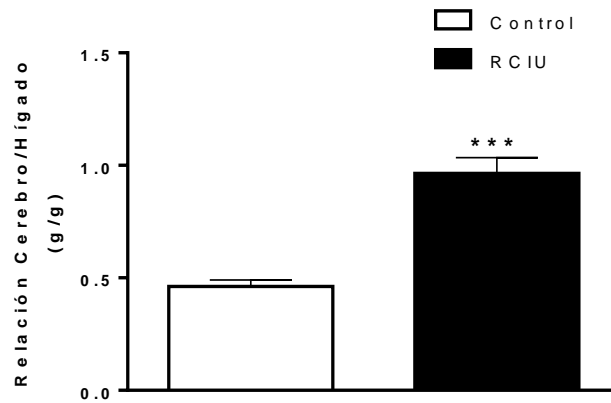


Figura 15. Relación peso cerebro/hígado (C/H). Se muestra la relación peso del cerebro e hígado fetal del grupo control (barras blancas, $n_{fetal}=10$) y RCIU (barras negras, $n_{fetal}=8$). Diferencias significativas (vs control): *** $p \leq 0,001$.

Reactividad vascular umbilical

Función vasoconstrictora

El ajuste de la curva concentración-respuesta a dosis ascendentes de K^+ demostró importantes diferencias entre los segmentos umbilicales Controles y RCIU (Figura 16).

La contracción máxima lograda fue significativamente menor para el grupo RCIU (Control $22,57 \pm 1,96$ vs RCIU $14,39 \pm 1,88$ mN, $p \leq 0.05$), manteniendo una sensibilidad similar (Figura 17).

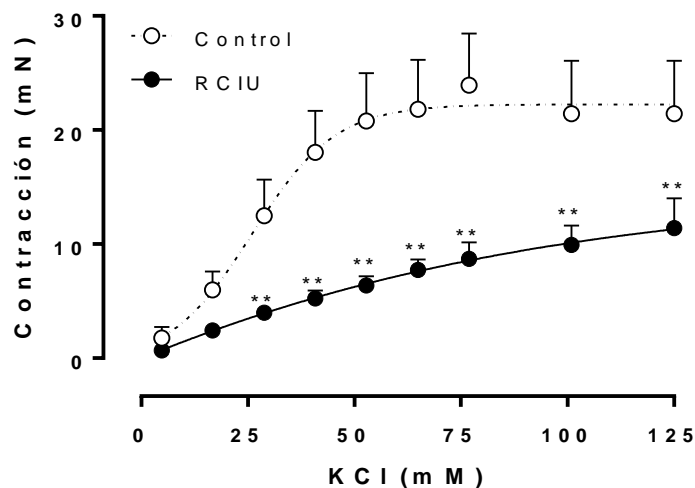


Figura 16. Contracción Arteria Umbilical. Se muestra la tensión (mN) ejercida un por segmento de la arteria umbilical en concentraciones ascendentes de KCl de grupo control (círculos blancos y línea discontinua, $n_{fetal}=10$) y RCIU (círculos negros y línea continua, $n_{fetal}=8$). Diferencias significativas (vs control): ** $p \leq 0,01$.

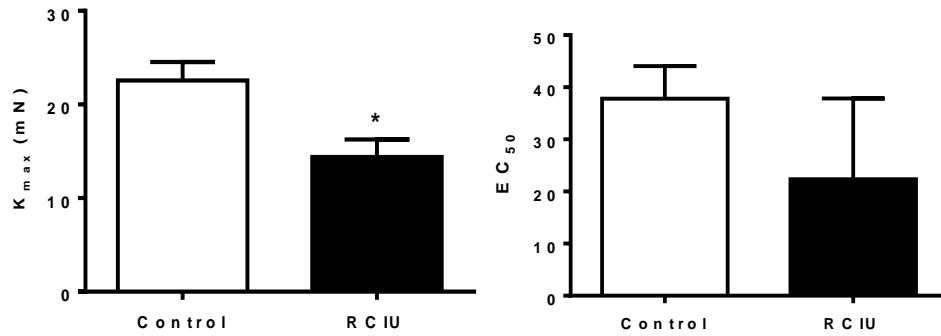


Figura 17. Capacidad contráctil de arterias umbilicales. Se muestra la fuerza (A, K_{max} , mN) y la sensibilidad (B, EC_{50}) de la arteria umbilical en grupo control (barras blancas, $n_{fetal}=10$) y RCIU (barras negras, $n_{fetal}=8$). Diferencias significativas (vs control): * $p \leq 0,05$.

Función vasodilatadora

Al ajustar la respuesta al dador de NO a una curva de agonista-respuesta de pendiente estándar, se obtuvo una curva sigmoidea con relajación máxima cercana al 75% (Figura 18). El análisis de esta curva entrega %Rmax similares para ambos grupos (Control $88,90 \pm 3,47$ vs RCIU $78,97 \pm 6,12\%$), mientras que el grupo RCIU mostró una mayor sensibilidad con un pD_2 significativamente mayor (Control $6,483 \pm 0,094$ vs RCIU $7,758 \pm 0,247$, $p \leq 0.001$) (Figura 19).

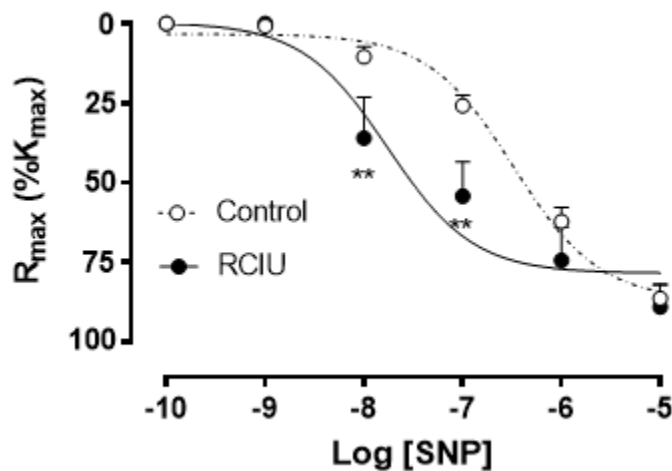


Figura 18. Vasodilatación dependiente de músculo. Se muestra la relajación de la arteria umbilical en concentraciones acumulativas de Nitroprusiato de Sodio (SNP) en el grupo control (círculos blancos y línea discontinua, $n_{fetal}=11$) y RCIU (círculos negros y línea continua, $n_{fetal}=8$). Diferencias significativas (vs control): ** $p \leq 0,01$.

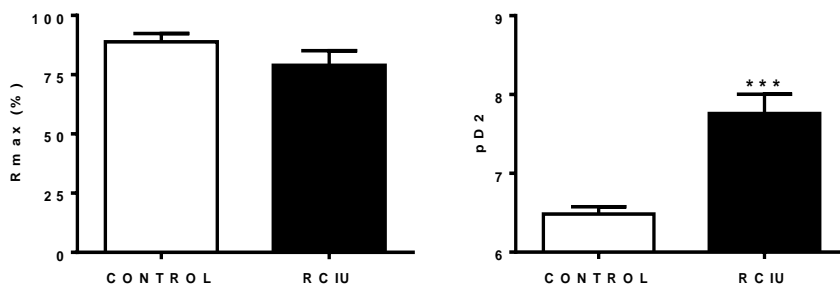


Figura 19. Respuesta vasodilatadora a SNP. Se muestra la R_{max} (A) y el pD₂ (B) en respuesta a SNP de las arterias umbilicales para el grupo control (barras blancas, n_{fetal}=11) y RCIU (barras negras, n_{fetal}=8). Diferencias significativas (vs control): *** p≤0,001.

Al administrar dosis acumulativas de Insulina (INS) sobre un vaso contraído, se evidencia la acción vasodilatadora dependiente de endotelio de este agente. En ambos grupos se obtuvo una curva de relajación, pero ésta es menor en el grupo RCIU (Figura 20). Al ajuste de una curva sigmoidea de Agonista vs. Respuesta Normalizada de pendiente variable, se obtiene una caída significativa del R_{max} en el grupo RCIU (Control 32,74 ±2,42 vs. RCIU 6,87 ±6,93 %, p ≤ 0.01). En contraste, ambos grupos presentaron una sensibilidad a INS similar, representada por pD₂ (Figura 21).

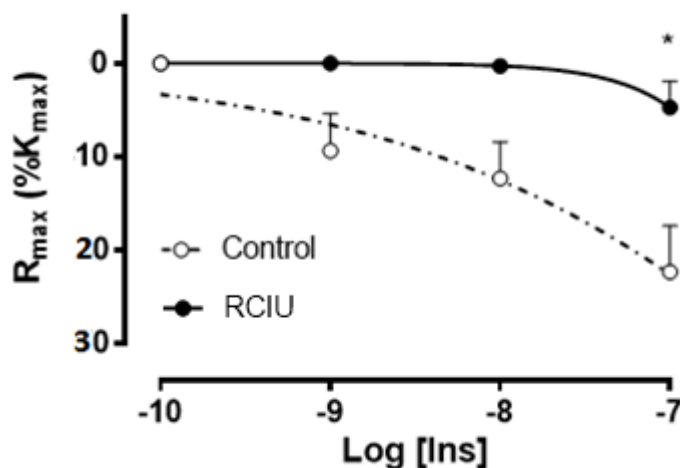


Figura 20. Vasodilatación dependiente de endotelio. Se muestra la relajación de la arterias umbilicales en concentraciones ascendentes de insulina (INS) en grupo control (círculos blancos y línea discontinua, n_{fetal}=11) y RCIU (círculos negros y línea continua, n_{fetal}=8). Diferencias significativas (vs control): * p≤0,05.

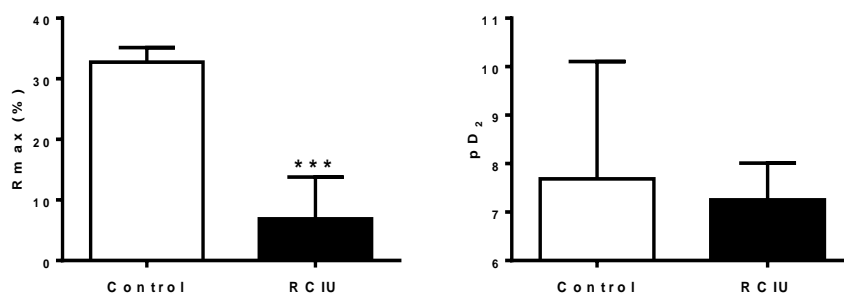


Figura 21. Respuesta vasodilatadora a Insulina. Se muestra la Rmax (A) y pD₂ (B) obtenida en la arterias umbilicales frente a dosis acumulativas de insulina para grupo control (barras blancas, n_{fetal}=10) y RCIU (barras negras, n_{fetal}=8). Diferencias significativas (vs control): ** p ≤ 0.01.

Función vasodilatadora y vía óxido nítrico

La respuesta basal a INS en el grupo RCIU posee un %Rmax menor que el Control (Control: 22,77 ± 4,37% vs. RCIU: 8,42 ± 1,20%), diferencias no consideradas significativas respecto de los valores Basales (Control 7,68 ± 2,42 vs. RCIU 7,25 ± 0,76) (Figura 22). Se estudió el efecto de un bloqueador de la eNOS (L-NAME) en la vasodilatación inducida por INS.

La incubación con L-NAME indujo una caída significativa de %Rmax (17,2%) de la respuesta vasodilatadora para el grupo Control, así como una significativa vasoconstricción en el grupo RCIU (Control 5,488 ± 4,8% vs RCIU 0,5 ± 10,1, p ≤ 0.5, RCIU Basal 8,42 ± 1,20% vs RCIU L-NAME -24,7 ± 10,1% p ≤ 0.001), pero una pD₂ sutilmente mayor pero significativo en el grupo RCIU (Control 7,928 ± 1,146 vs RCIU 8,096 ± 0,782, p ≤ 0.5) (Figura 22).

Para determinar el rol de arginasa en la vasodilatación dependiente de endotelio inducida por INS, se repitió la curva dosis respuesta a INS en presencia de inhibidor de la arginasa (BEC). La incubación con BEC indujo un aumento significativo de %Rmax para ambos grupos en estudio (Control 64,68 ± 9,56% vs RCIU 21,42 ± 2,32%, RCIU Basal 8,42 ± 1,20% vs RCIU BEC 21,42 ± 2,32% p ≤ 0.001), sin embargo este aumento fue mayor en el grupo control. Además, BEC indujo un ascenso significativo de la sensibilidad solo en el grupo RCIU (Basal 4,553 ± 1,220 vs BEC 8,274 ± 0,229, p ≤ 0.5) a este fármaco (Figura 22).

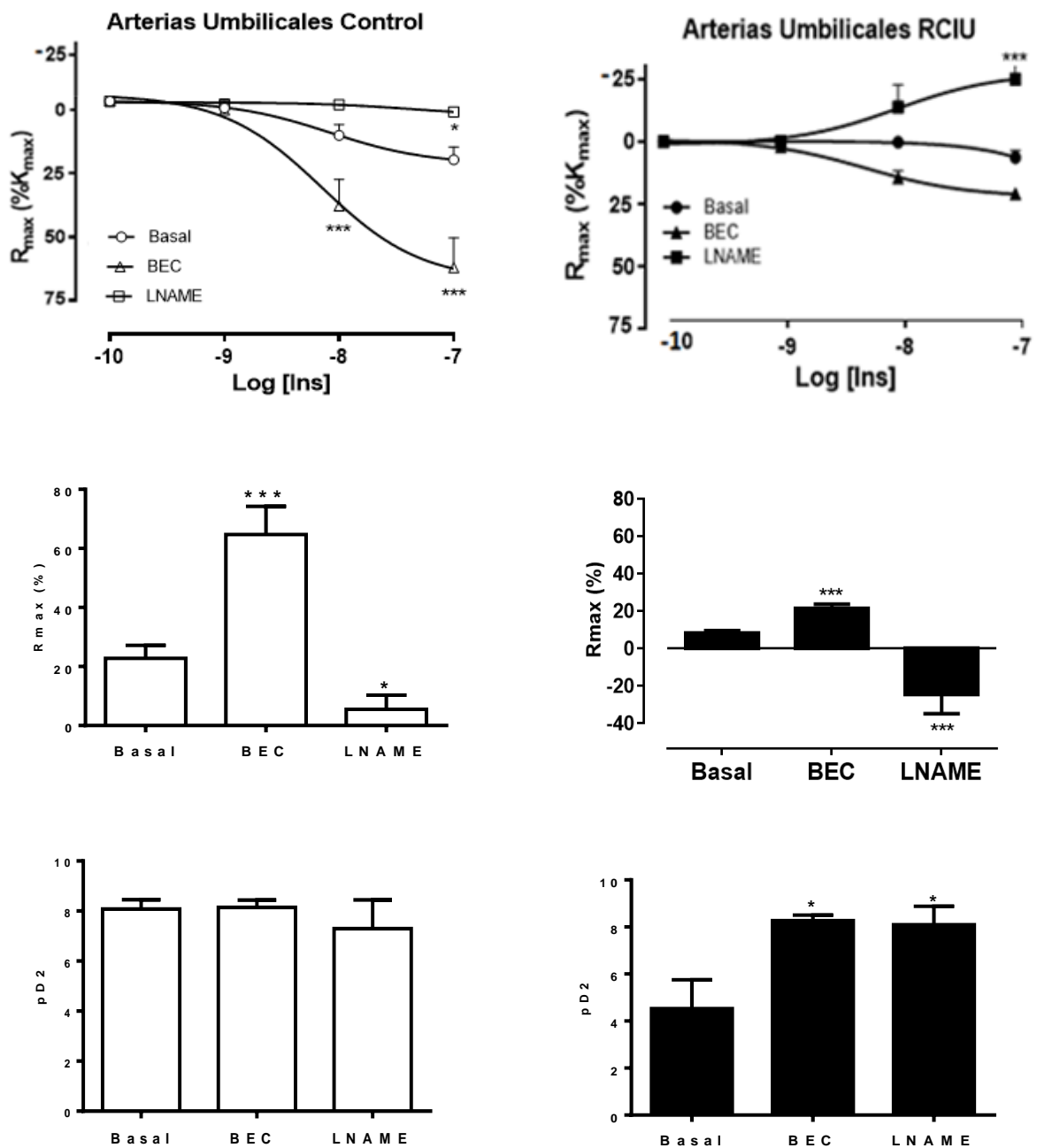
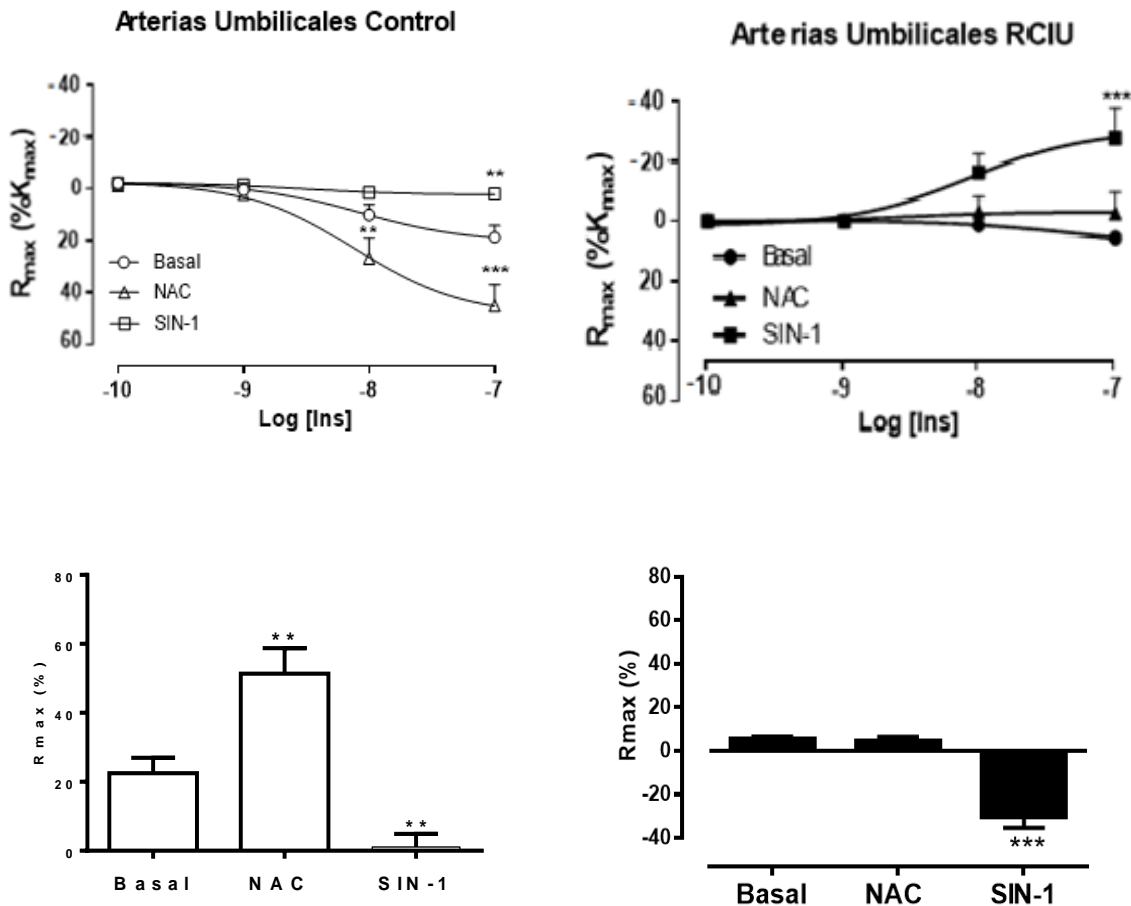


Figura 22. Vasodilatación con Inhibidores. Se muestra la relajación de la arterias umbilicales de animales Control (símbolos y barras blancos, $n_{\text{fetal}}=6$) y RCIU (símbolos y barras negras $n_{\text{fetal}}=11$) en concentraciones ascendentes de INS en basal (círculos), en presencia de BEC (triángulos, inhibidor arginasa) y L-NAME (cuadrados, bloqueador actividad eNOS), con su R_{max} y pD_2 calculados. Diferencias significativas (vs Basal): * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$.

Función vasodilatadora y efecto de Pro-oxidante y anti-oxidante.

En presencia del anti oxidante NAC la %Rmax a INS tuvo un ascenso significativo ($51,34 \pm 7,45\%$, $p \leq 0,01$ vs Basal) para el grupo Control. En contraste, en el grupo RCIU bajo la misma condición, se observó una respuesta similar con respecto de Basal (Control $51,341 \pm 7,454$ vs RCIU $4,762 \pm 1,785$, RCIU Basal $5,688 \pm 0,904$ vs RCIU NAC $4,762 \pm 1,785$, $p \leq 0.01$) (Figura 23). Finalmente, NAC no indujo diferencias en la pD_2 en ambos grupos.

Por otro lado, la incubación con un pro-oxidante (SIN-1) determinó una abolición de la respuesta vasodilatadora (basal vs SIN-1 para el grupo Control, $p \leq 0.01$) (Figura 23). Por su parte el grupo RCIU, no solo presentó una abolición de la vasodilatación inducida por INS, sino que se indujo una marcada vasoconstricción (Control $1,087 \pm 3,844$ vs RCIU $1,652 \pm 4,875$, RCIU Basal $5,688 \pm 0,904$ vs RCIU SIN-1 $-30,52 \pm 4,875$, $p \leq 0.001$) (Figura 23). Tanto para el grupo RCIU como el Control no se presentaron modificaciones significativas en la pD_2 bajo ninguna de las tres condiciones (Figura 23).



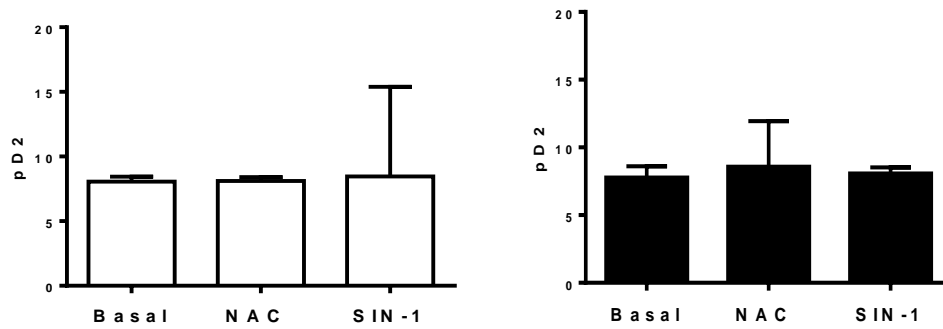


Figura 23. Vasodilatación con Pro y Anti Oxidante. Se muestra la relajación de la arterias umbilicales de animales Control (símbolos y barras blancos, $n_{\text{fetal}}=11$) y RCIU (símbolos y barras negras $n_{\text{fetal}}=8$) en concentraciones ascendentes de INS en basal (círculos) o en presencia de NAC (triángulos, antioxidante) y SIN-1 (cuadrados, pro oxidante), con su R_{max} y pD_2 calculados. Diferencias significativas (vs Basal): ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

DISCUSIÓN

La presente memoria de título permitió caracterizar un novedoso modelo de RCIU mediante oclusión progresiva de arterias uterinas en cobayos. Este estudio es único en el mundo y aún no ha sido publicado *in extenso*. De hecho, muchos de los resultados ultrasonográficos y de función vascular ni siquiera han sido descritos para una gestación normal en cobayas. En particular, este estudio se ha enfocado en describir el crecimiento fetal intrauterino y la función vascular umbilical, pudiendo describir las características de una gestación normal y de una marcada restricción de crecimiento asimétrica cercana al 46%. Esta caída en el peso de los fetos se asoció a una disminución de la eficiencia placentaria y marcados cambios en la función vascular, tanto *in vivo* como *ex vivo*. Es más, los estudios *ex vivo* permitieron describir mecanismos que están participando en la RCIU, como una menor capacidad vasodilatadora dependiente de NO en arteria umbilical. Este modelo pareciera asemejarse en lo que ocurre en gestaciones RCIU de otras especies animales, incluyendo al humano (Alegría *et al*, 2014), lo cual permite postular este paradigma de cobayo como un buen modelo para estudiar RCIU por insuficiencia placentaria. Por lo tanto, esta memoria de título aporta nuevos conocimientos a la fisiología y fisiopatología de gestación en cobayas, que podrían ser extrapoladas a gestaciones en otras especies.

Eco-Doppler Umbilical

Es necesario tener en cuenta que la ecografía Doppler proporciona un método no invasivo para el estudio de la hemodinámica fetal. Los valores de S/D, IR e IP umbilicales dan información sobre la circulación feto placentaria, además de estos índices, la forma de onda de flujo puede ser descrita o clasificada por la presencia o ausencia de una característica particular, por ejemplo la ausencia de flujo diastólico final y la presencia de una muesca post-sistólica.

El grupo Control mostró una negativa correlación entre los días de gestación y el valor de los índices Doppler, situación considerada fisiológica para *Cavia porcellus*, en donde se obtuvo valores de IR similares a otros estudios con el mismo modelo (Turner y Trudinger, 2000; Turner y Trudinger, 2009). Además este tipo de correlación se ha descrito en otras especies tales como caninos (Di Salvo *et al*, 2006; Baschat *et al*, 2011), felinos (Blanco *et al*, 2014) y equinos (Bollwein *et al*, 2004), así como en humanos (Cafíci, 2003c; Kyle y Sankaran, 2009), lo que en definitiva se refleja como un flujo anterógrado progresivamente mayor en la forma de onda Doppler de la arteria umbilical.

El aumento de la resistencia de la perfusión feto-placentaria en el grupo RCIU fue detectado tempranamente en el tramo post quirúrgico temprano por la elevación de S/D, y en etapas posteriores por la reducción de la pendiente en IR e IP, explicado por el crecimiento centrípeto del ameroide en el anillo sobre las arterias uterinas. El aumento de IR e IP a lo largo de la gestación, es una situación común en embarazos humanos con RCIU (Cafíci, 2003c, Baker *et al*, 2004). Sin embargo, el IR medido difiere levemente en el modelo caviomorfo de Turner y Trudinger (2009), donde mostraron aumentos significativos solo hacia el final de la gestación, desde el día 57 en adelante. Estudios clínicos describen que el aumento sostenido de estas variable ecográfica se asocia con la perturbación en el patrón de angiogénesis placentaria, desde uno ramificado a uno no ramificado (Aronow *et al*, 2013; Davidge *et al*, 2013). Esto último se ha asociado a un elevado riesgo de acidosis fetal y muerte perinatal, así como a un bajo peso fetal a término en gestaciones RCIU (Cafíci, 2003c; Kyle y Sankaran, 2009; Turan *et al*, 2013; Kessous *et al*, 2014). La maduración y especialización del sistema vascular está influenciado por señales ambientales como: el flujo de la sangre, la tensión de O₂ y el EOx. La fricción del lumen arterial modula positivamente la síntesis y liberación de NO, sustancia clave en la angiogénesis y maduración normal de la placenta durante la gestación (Garing y Berk, 2006; Krause *et al*, 2011). Sin embargo, condiciones como EOx y/o disminución de cofactores de eNOS, traen consigo una reducción en la biodisponibilidad de NO, pudiendo aumentar la resistencia vascular, disminuir la perfusión útero-placentaria e inducir hipoxia fetal (Chiba *et al*, 2010; Herrera *et al*, 2014).

Biometría Fetal y peso de órganos fetales

El grupo Control mostró valores de DBP, DAP, y AT equivalentes a los descritos en la literatura para animales normales, tomando en consideración la edad gestacional (Turner y Trudinger, 2000; Turner y Trudinger, 2009, Santos *et al*, 2014). Para el caso de CA y LF, no se pudo encontrar referencias bibliográficas, por los que esta memoria estaría describiendo por primera vez estas variables en los fetos de cobayo. En el caso del grupo RCIU, el DBP sufrió modificaciones significativas respecto del grupo Control pero no del peso cerebral, un escenario similar fue descrito para los fetos RCIU del modelo de Turner y Trudinger (2009). Lo anterior sugiere una redistribución de flujos para sostener el desarrollo del cerebro, fenómeno cardiovascular de “centralización de flujos”, descrito en distintas especies, incluyendo al humano (Gagnon, 2006; Herrera *et al*, 2014).

Esta respuesta fetal consiste en una dilatación de la circulación cerebral acompañada de una intensa vasoconstricción periférica y de órganos abdominales en respuesta a la hipoxemia fetal. De esta manera, se protegen y conservan funciones vitales, favoreciendo el flujo sanguíneo a glándulas adrenales, corazón y cerebro (Cafíci, 2003c; Gagnon, 2006). Existen evidencias de que el efecto preservador del flujo cerebral es un mecanismo protector de inicio temprano, que al prolongarse precede a la aparición de la desaceleración del crecimiento fetal (Cafíci, 2003c; Gagnon, 2006; Gluckman *et al*, 2008).

Mediante las mediciones ecográficas del grupo RCIU se observa una disminución de la CA y una modificación de las relaciones corporales, como es C/H, dando un crecimiento asimétrico de estos fetos, hallazgo descrito con anterioridad para la especie por Turner y Trudinger (2009). El menor crecimiento abdominal de los fetos RCIU, está explicado principalmente por un menor desarrollo del hígado fetal y sistema gastrointestinal, menor reserva del depósito adiposo, lo que ha sido descrito en la literatura tanto en modelos animales como en fetos humanos (Cafíci, 2003a, Larciprete *et al*, 2005; Morales-Rosselló y León-Mendoza, 2005; Turner y Trudinger, 2009). Lo anterior se explica porque las anomalías hemodinámicas umbilicales (aumento en S/D, IR e IP) ocurridas durante el periodo post implantación del AA, se asocian con un impacto negativo sobre la irrigación de las arterias mesentéricas, así como de los sinusoides hepáticos (Cafíci, 2003c; Turan *et al*, 2013), determinando una reducción de nutrientes y oxígeno. Ahora bien, la literatura describe qué afecciones en la mitad de la gestación afectan principalmente el crecimiento hipertrófico (por sobre la mitosis) de los órganos fetales, hecho que explicaría resultados descritos para los órganos fetales del grupo RCIU. Es probable que el compromiso tardío de LF sea porque el crecimiento de este y otros huesos largos se encuentra en un periodo avanzado y por tanto, sus células sean menos sensibles a alterar su ciclo (Proctor *et al*, 2010).

La placenta tiene cometidos fisiológicos tales como: intercambio de gases, transporte de nutrientes, secreción hormonal, función excretora, función de hígado transitorio y función inmunológica (Lager y Powell, 2012). Por lo tanto, disfunciones o incompetencias placentarias inducen una carencia funcional multi-orgánica en el feto, estableciéndose alteraciones que afectan la fisiología fetal (Baker *et al*, 2004; Abe *et al*, 2013; Boldrini *et al*, 2013).

Estudios clínicos en humanos así como en modelos en ovino, murino y caviomorfo de RCIU por compromiso útero-placentario (UP), reportan una disminución significativa de la superficie capilar placentaria, así como del volumen total de la placenta (Schröder, 2003; Aronow *et al*, 2013). Estos resultados son consistentes con nuestros hallazgos, en donde una superficie vascular placentaria disminuida podría aumentar los índices de resistencia umbilical, reducir el crecimiento fetal y establecer disfunción umbilical. La razón F/P es una forma de determinar el grado de suficiencia de la placenta para sostener un crecimiento óptimo del feto. Los valores F/P obtenidos para ambos grupos son equivalentes a los descritos por Turner y Trudinger (2009), por lo que es posible afirmar que las gestaciones del grupo RCIU desarrollaron un cuadro de insuficiencia placentaria crónica. Sin embargo, a diferencia el estudio de Turner y Trudinger que presentó infartos placentarios, las placentas del presente estudio no presentaron zonas infartadas. Futuros estudios histo-morfológicos podrían determinar los efectos estructurales placentarios de este modelo.

Reactividad Vascular Umbilical

Para el grupo Control, la curva sigmoidea generada para la contracción dependiente de voltaje en presencia de KCl describe valores ligeramente superiores de Kmax respecto de arterias umbilicales de fetos humanos considerados normales (Krause *et al*, 2012; Krause *et al*, 2013). La significativa reducción de fuerza contráctil del grupo RCIU a concentraciones ascendentes de KCl, es un escenario ya descrito para las arterias umbilicales de fetos humanos con la misma condición (Krause *et al*, 2013). Unos de los potenciales mecanismos detrás de esta alteración se relacionan con los canales de Kv sensibles a O₂ (O₂Kv), esenciales para la función celular endotelial vascular normal, incluyendo la liberación del EDHF que modula localmente el tono del músculo liso, siendo clave en la relajación normal a agonistas. Los ROS regulan la función de los O₂Kv y su aumento exacerbado contribuye al desarrollo de patologías cardiovasculares. La literatura describe que inducciones crónicas de ROS perturban la reactividad vascular de vasos umbilicales aislados (Wareing y Greenwood, 2011, Herrera *et al*, 2014) tal y como ha sido informado en la presente memoria de título. La respuesta vasodilatadora dependiente de músculo fue evaluada mediante el uso de SNP, un donante de NO, que activa de manera directa la guanilato ciclasa soluble presente en músculo liso, resultando en una mayor concentración de cGMP intracelular, que relaja al músculo liso umbilical (Lovren y Triggle, 2000; Wanstall *et al*, 2005; Leung *et al*, 2006).

En la presente memoria, tanto el Rmax como el pD2 obtenidos para el grupo Control y RCIU son sustancialmente superiores a lo descrito por Leung *et al* (2006) para arterias umbilicales de fetos humanos a término, ya que estos últimos poseen una baja sensibilidad a vasodilatadores, en especial los que actúan en la vía NO, con el fin de prevenir pérdidas críticas de sangre del feto durante el parto (Leung *et al*, 2006).

La explicación al incremento de la pD2 umbilical a SNP en el grupo RCIU, se sustenta en que el aumento de la concentración de NO en la capa muscular lisa vascular, producto del incremento de la NOS inducible (iNOS) en condiciones patológicas, modifica positivamente la respuesta de canales Kv y K_{Ca} quienes aportan un mecanismo efector complementario al de cGMP, lo que explicaría la fuerte caída en la pendiente de la curva agonista-respuesta (Lovren y Triggle, 2000; Wanstall *et al*, 2005; Koumallos *et al*, 2014). Otra explicación descrita por la literatura, pero que no fue evaluada en esta memoria de título, se relaciona con los mecanismos celulares subyacentes a contracción/relajación miogénica, que incluyen cambios en el transporte intracelular de calcio. Por ejemplo, a través de los canales de calcio de tipo L y canales de TRPC6 de las células musculares lisas vasculares, así como un variaciones en la sensibilidad al calcio de la maquinaria contráctil a través de la activación de la Proteína quinasa C, MAP quinasas, y / o la vía RhoA-Rho-quinasa (Hampl y Jakoubek, 2009; Yao *et al*, 2010).

La respuesta vasodilatadora dependiente de endotelio fue medida a través de INS, la cual desempeña un papel importante en la regulación de la actividad vasomotora (Muniyappa *et al*, 2007; Szijártó *et al*, 2014). La acción vasodilatadora se atribuye principalmente a la liberación de NO, la vía de señalización de INS en el endotelio vascular regula la NO-sintasa endotelial (eNOS) empleando un mecanismo dependiente de la fosforilación, a través de los receptores de INS y posterior activación de la vía fosfatidilinositol 3-quinasa / Akt (Muniyappa *et al*, 2007). Al igual que en los agentes vasoactivas previos, %Rmax del grupo Control es superior al de fetos humanos descritos en la literatura (Krause *et al*, 2013). En cuanto a la respuesta encontrada en los fetos RCIU, la capacidad de relajación INS-dependiente fue mermada respecto de fetos Control, resultados comparables a estudios en fetos humanos clasificados clínicamente como restringidos (Krause *et al*, 2012), quienes mostraron disfunción endotelial.

La disfunción endotelial es un estado patológico del endotelio, que se caracteriza por un desequilibrio entre los factores relajantes derivados del endotelio por ejemplo: NO y la prostaciclina y factores constrictores derivados del endotelio por ejemplo, tromboxano A2 (TXA2), prostaglandina H2 (PGH2) y endotelina-1 (Daiber *et al*, 2014). Una característica distintiva de la disfunción endotelial es una reducción de la biodisponibilidad de NO, que puede ser causada por una expresión reducida de la eNOS, disminuida activación y desacoplamiento de la eNOS, o inactivación de NO por anión superóxido (Daiber *et al*, 2014).

El uso de inhibidores en el grupo Control, tales como BEC, que interrumpe la degradación de la L-arginina a urea y L-ornitina por parte de la arginasa en la vía de formación de NO y LNAME, un bloqueador específico de la eNOS, permite comprender el aporte relativo de ambas enzimas en la función vasodilatadora dependiente de NO en sujetos normales. La mejora en la respuesta vasodilatadora mediada por INS en arterias umbilicales pre incubadas con BEC, ya había sido reportada por Krause *et al* (2013) para fetos humanos normales, lo cual coincide con nuestro reporte tanto para sujetos Control como RCIU, con la diferencia que %Rmax obtenido para *Cavia porcellus* es superior. En condiciones fisiopatológicas, se ha demostrado la activación de arginasa en vasos umbilicales de neonatos humanos RCIU (Chandra *et al*, 2012; Krause *et al*, 2012). Además se ha reportado que ROS como por ejemplo H₂O₂ incrementan la actividad de arginasa en las células endoteliales a través de la ruta de la quinasa RhoA / Rho (Chandra *et al*, 2012), situaciones que podrían relacionarse al aumento de la pD2 para BEC en el grupo RCIU, en que prevalece posiblemente alguna isoforma de arginasa de la que BEC es más ávida.

A la vez, la respuesta frente a LNAME presentó una radical caída respecto de la condición basal, lo que sugiere fuertemente que el NO es el principal vasodilatador de la arteria umbilical para los fetos de cobayo. Esto ha sido descrito para el territorio feto-placentario de distintas especies (Hampl y Jakoubek, 2009; Krause *et al*, 2013; Dyson *et al*, 2014; Herrera *et al*, 2014). La fuerte respuesta contráctil (y casi nula vaso relajación) en presencia de L-NAME en el grupo RCIU refuerza la idea que la formación de NO mediada por eNOS, es de radical importancia en la respuesta endotelial umbilical, y por lo tanto, una disminución de eNOS o sus sustratos claramente está participando en la disfunción endotelial umbilical pesquisada en los cobayos RCIU de esta memoria de título.

La exposición de las arterias umbilicales de animales Control a SIN-1 -un pro oxidante- demuestra la importancia que tiene el adecuado balance oxidativo en la función vasodilatadora. La casi nula respuesta vasodilatadora en este grupo se debe probablemente a la neutralización del NO y el desacoplamiento de la eNOS, estado en que la eNOS reduce el O₂ en lugar de transferir electrones a L-arginina, produciendo O₂⁻ y H₂O₂, un proceso aún más perjudicial que la inhibición de la eNOS, puesto que su desacoplamiento cambiará la enzima desde una fuente de NO a una de anión superóxido. Esta modificación lleva la eNOS de un fenotipo protector/beneficioso a uno perjudicial/tóxico. Ambos mecanismos derivan en una limitada biodisponibilidad de NO y a un aumento progresivo del Eox (Al-Gubory *et al*, 2010; Davis *et al*, 2010; Daiber *et al*, 2014; Montezano y Touyz *et al*, 2014).

A diferencia, el antioxidante NAC en las arterias umbilicales Control mejora la respuesta vasodilatadora respecto de la condición basal, el mecanismo subyacente se basaría en que este fármaco es un precursor directo en la síntesis de GSH (glutatión) intracelular y actúa como un neutralizador directo de radicales libres como OH⁻, H₂O₂ y O₂⁻, favoreciendo la función endotelial y la biodisponibilidad de NO. Sorprendentemente, NAC no mejoró la función vasodilatadora dependiente de endotelio, probablemente por una marcada disfunción endotelial que el antioxidante no es capaz de rescatar. Es posible que en una gestación RCIU de término, los daños celulares vasculares hayan comprometido mecanismos que no son revertidos por la neutralización de ROS. Sin embargo, esto no descarta el uso de antioxidantes en gestaciones más tempranas, cuando el daño no esté tan avanzado.

Futuros estudios debieran focalizarse en el desarrollo de la disfunción endotelial a lo largo de la gestación y posibles ventanas terapéuticas con antioxidantes. Se ha asociado con ROS, la progresión acelerada de ciertas enfermedades. Sin embargo, estudios epidemiológicos sugieren fuertemente que los antioxidantes, en concentraciones adecuadas, puede disminuir la incidencia de algunas condiciones patológicas (Guvendag *et al*, 2013; Daiber *et al*, 2014). Sin embargo, una de los grandes retos de este campo, es la comprensión parcial de la farmacodinamia funcional de agentes antioxidantes en la biología animal y su respectivo ajuste clínico. Finalmente, esta memoria ha aportado nuevos conocimientos a un área de la biomedicina que aún tiene muchas preguntas por responder y que sin duda este modelo ayudará para aclarar los mecanismos determinantes de la RCIU.

CONCLUSIONES

1. Esta memoria de título ha permitido la caracterización de un novedoso modelo de RCIU, que ayudaría a estudiar de mejor forma los efectos cardiovasculares que sufren individuos gestados bajo condiciones de compromiso de la perfusión útero-placentaria.
2. Según este estudio, el aumento de los índices del eco-Doppler umbilical demuestra ser un signo clínico temprano para diagnosticar una gestación anormal y de riesgo para la salud feto-neonatal del cobayo.
3. Las curvas de biometría fetal confirman ser de gran utilidad para este modelo, al estimar alteraciones del crecimiento de órganos fetales y predecir el peso del recién nacido, sustentada por una alta correlación entre las variables biométricas y la edad gestacional.
4. En particular, este modelo RCIU tiene una marcada disfunción endotelial umbilical, con una menor vasodilatación dependiente de endotelio, que mejora mediante la inhibición de arginasas, pero no a la exposición del anti oxidante.
5. Este modelo de cobayo es un paradigma de RCIU, que una vez implementado, permitiría a otros estudios indagar en los mecanismos y potenciales terapias para esta condición que afecta tanto a humanos como otras especies animales.

BIBLIOGRAFÍA

ABDALLA, M. F.; HARRINGTON, F.K. 2005. Review: Prediction and prevention of preeclampsia and IUGR. *Early Human Development* 81:865-876

ABE, S.; HASEGAWA, Y.; HIGASHIJIMA, A.; JO, O.; KINOSHITA, A.; MASUZAKI, H.; MISHIMA, H.; MIURA, K.; MIURA, S.; YAMASAKI, K.; YOSHIDA, A.; YOSHIURA, K. 2013. Characterization of placenta-specific microRNAs in fetal growth restriction pregnancy. *Prenatal Diagnosis* 33, 214–222

ALEGRÍA, R.A; SCHNEIDER, D.; FARIAS, M.; KRAUSE, B.J; HERRERA, E.A. 2014. Fetal biometry, umbilical Doppler and vascular reactivity in IUGR induced by progressive occlusion of uterine arteries in guinea pigs. IPW 2014, International Postgraduate Workshop. Santiago, Chile, Octubre

AL-GUBORY, K.H.; FOWLER, P.A.; GARREL, C. 2010. The roles of cellular reactive oxygen species, oxidative stress and antioxidants in pregnancy outcomes. *Int J Biochem Cell Biol* 42:1634–1650

ANGUS, J.A; WRIGHT, C.E. 2000. Techniques to study the pharmacodynamics of isolated large and small blood vessels. *J Pharmacol Toxicol Methods* 44(2):395-407

ARONOW, B.; CROMBLEHOLME, T.M. HABLI, M.; JONES, H.; OMAR, K. 2013. Recapitulation of characteristics of human placental vascular insufficiency in a novel mouse model. *Placenta* 34 (2013), 1150-1158.

BAHTIYAR, O.Z; COPEL, A.J. 2008. Cardiac Changes in the Intrauterine Growth-Restricted Fetus. *Seminar in Perinatology* 32:190-193

BAKER, P. N.; MAYHEW, T. M.; ONG, S. S. WIJESEKARA, J. 2004. Morphometric Evidence that Villous Development and Fetoplacental Angiogenesis are compromised by Intrauterine Growth Restriction but not by Pre-eclampsia. *Placenta* 25:829-833

BASCHAT, A. A.; GEMBRUCH U.; HARMAN, C.R; SALIM, M.; BERG, C.; BLANCO, P.G.; RODRÍGUEZ, R.; RUBE, A.; ARIAS, DO.; TÓRTORA, M.; DÍAZ, J.D.; GOBELLO, C. 2011. Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy. *Anim Reprod Sci* 126(1-2):130-5.

BLANCO, P.G; RODRÍGUEZ, R.; OLGUÍN, S.; RUBE, A.; TÓRTORA, M.; GOBELLO, C. 2014. Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal arteries during normal feline gestation. *Anim Reprod Sci* 146(1-2):63-9

BOLDRINI, A.; COCEANI, F.; GENAZZANI, A.R.; PISANESCHI, S.; SIMONCINI, T.; 2013. Feto-placental vascular dysfunction as a prenatal determinant of adult cardiovascular disease. *Intern Emerg Med* 8 (Suppl 1):S41-S45

BOLLWEIN H, WEBER, F.; WOSCHÉE, I.; STOLLA, R. 2004. Transrectal Doppler sonography of uterine and umbilical blood flow during pregnancy in mares. *Theriogenology*. 15; 61(2-3)

BURTON, J.G; JAUNIAUX, E. 2011. Oxidative stress. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 25:287-299

CAFICI, D. 2003a. Cap. 4: Biometría Fetal. **IN: CAFÍCI, D.; MEJÍDES, A.; SEPÚLVEDA, W.** Ultrasonografía en obstetricia y diagnóstico prenatal. 1ºEd. Ediciones Journal. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

CAFICI, D. 2003b. Cap. 5: Evaluación mediante ultrasonido de las desviaciones del crecimiento fetal. **IN: CAFÍCI, D.; MEJÍDES, A.; SEPÚLVEDA, W.** Ultrasonografía en obstetricia y diagnóstico prenatal. 1ºEd. Ediciones Journal. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

CAFICI, D. 2003c. Cap. 8: Doppler en obstetricia. **IN: CAFÍCI, D.; MEJÍDES, A.; SEPÚLVEDA, W.** Ultrasonografía en obstetricia y diagnóstico prenatal. 1ºEd. Ediciones Journal. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

CHANDRA, S.; ROMERO, M.J.; SHATANAWI, A.; ALKILANY, A.M; CALDWELL RB, CALDWELL R.W. 2012. Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway. *Br J Pharmacol* 165(2):506-519

CHIBA, T.; OMORI, A.; TAKAHASHI, K.; TANAKA, K.; KUDO, K.; MANABE, M.; MARIYA, Y.; KASHIWAKURA, I. 2010. Correlations between the detection of stress-associated hormone/oxidative stress markers in umbilical cord blood and the physical condition of the mother and neonate. *J Obstet Gynaecol Res* 36(5):958-64.

DAIBER, A.; OELZE, M.; DAUB, S.; STEVEN, S.; SCHUFF, A.; KRÖLLER-SCHÖN, S.; HAUSDING, M.; WENZEL, P.; SCHULZ, E.; GORI, T.; MCUNZEL, T. 2014. Chapter 49: Vascular Redox Signaling, Redox Switches in Endothelial Nitric Oxide Synthase and Endothelial Dysfunction. **IN: LAHER, I.** Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 1177-1212

DAVIDGE, S. T; GUILBERT, L. R; JIANG, Y.; RIDDELL, M. R; WINKLER-LOWEN, B. 2013. Fibrocyte-Like Cells from Intrauterine Growth Restriction Placentas Have a Reduced Ability to Stimulate Angiogenesis. *Am J Pathol* 2013, 183: 1025-1030.

DAVIS, J.M.; AUTEN, R.L. 2010. Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 15:191–195

DI SALVO, P.; BOCCI, F.; ZELLI, R.; POLISCA, A. 2006. Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch. *Res Vet Sci* 81(3):382-8

DYSON, R.M.; PALLISER, H.K.; LAKKUNDI, A.; DE WAAL, K.; LATTE, J.L.; CLIFTON, V.L.; WRIGHT, I.M. 2014. Early microvascular changes in the preterm neonate: a comparative study of the human and guinea pig. *Physiol Rep.*17; 2(9)

EVANS, L.C; LIU, H; PINKAS, G.A; THOMPSON, L.P. 2012. Chronic hypoxia increases peroxynitrite, MMP9 expression, and collagen accumulation in fetal guinea pig hearts. *Pediatric Research*, 71(1):25-31.

FILLY, A.R; GALA, L.H; PANDIPATI, S. 2009. Cap.7: Evaluación ecográfica de la biometría y de las anomalías del crecimiento fetal. **IN:** Ecografía en obstetricia y ginecología, 5ª Ed. Callen. W, Peter. Barcelona, España. pp. 247-261.

GAGNON, R. 2006. An Obstetric Point of View on Fetal Adaptation and Reprogramming. *Neoreviews* 7:e189-e194

GIUSSANI, D.A.; CAMM, E.J.; NIU, Y.; RICHTER, H.G.; BLANCO, C.E; GOTTSCHALK, R.; BLAKE, E.Z.; HORDER, K.A.; THAKOR, A.S.; HANSELL, J.A.; KANE, A.D.; WOODING, F.B.; CROSS, C.M.; HERRERA, E.A. 2012. Morphological and Functional Alterations in the Aorta of the Chronically Hypoxic Fetal Rat. *J Vasc Res.* 49(1):50-58.

GLUCKMAN, P.D; HANSON, M.A; COOPER, C; THORNBURG, K.L. 2008. Effect of in utero and early-life conditions on adult health and disease. *The New England Journal of Medicine* 359(1):61-73

GONG, J.S.; KIM, G.J. 2014. The role of autophagy in the placenta as a regulator of cell death. *Clin Exp Reprod Med* 41(3):97-107

GUVENDAG, E.S; KARCAALTINCABA, D.; KANDEMIR, O.; KIYKAC, S.; MENTESE, A. 2013. Cord blood oxidative stress markers correlate with umbilical artery pulsatility in fetal growth restriction. *J Matern Fetal Neonatal Med* 26(6): 576–580

HAMPL, V.; JAKOUBEK, V. 2009. Mini Review: Regulation of Fetoplacental Vascular Bed by Hypoxia. *Physiol Res* 58 Suppl. 2: S87-S93

HERRERA, E.A; KRAUSE, B. J; EBENSPERGER, G.; REYES, R. V; CASANELLO, P; PARRA-CORDERO, M.; LLANOS, A.J. 2014. The placental pursuit for an adequate oxidant balance between the mother and the fetus. *Front Pharmacol.* 5:149.

ISMAIL, H.; CHANG. Y. 2012. Sequelae of Fetal Growth Restriction. *Journal of Medical Ultrasound* 20(4):191-200

KESSOUS, R.; ARICHA-TAMIR, B.; WEINTRAUB, A.Y.; SHEINER, E.; HERSHKOVITZ R. 2014. Umbilical artery peak systolic velocity measurements for prediction of perinatal outcome among IUGR fetuses. *J Clin Ultrasound* 42(7):405-10

KRAUSE, B.J.; CARRASCO-WONG, I.; CANIUGUIR, A.; CARVAJAL, J.; FARIÁS, M.; CASANELLO, P. 2013. Endothelial eNOS/arginase imbalance contributes to vascular dysfunction in IUGR umbilical and placental vessels. *Placenta* 34(1):20-8

KRAUSE, B.J; HANSON, M.A; CASANELLO, P. 2011. Role of nitric oxide in placental vascular development and function. *Placenta* 32(11):797-805

KRAUSE, B.J; PRIETO, C.P; MUÑOZ-URRUTIA, E.; SAN MARTÍN, S.; SOBREVIA, L.; CASANELLO, P. 2012. Role of arginase-2 and eNOS in the differential vascular reactivity and hypoxia-induced endothelial response in umbilical arteries and veins. *Placenta* 33 (2012) 360e366

KYLE, M.P.; SANKARAN, S. 2009. Aetiology and Pathogenesis of IUGR. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology* 23:765–777

LAGER, S.; POWELL, T.L. 2012. Review Article: Regulation of Nutrient Transport across the Placenta *Journal of Pregnancy*, Article ID 179827 (14).

LARCIPRETE, G.; VALENSISE, H.; DI PIERRO, G.; VASAPOLLO, B.; CASALINO, B.; ARDUINI, D.; JARVIS, S.; CIRESE, E. 2005. Intrauterine growth restriction and fetal body composition. *Ultrasound Obstet Gynecol* 26(3):258-62

LESHEM, S.S; LOTSIKAS, P.J; BRENT REIMER, S. 2008. In vitro expansion patterns of ameroid ring constrictors. *American Journal Veterinary Research* 69(11):1520-4

LEUNG, S.W.; QUAN, A.; LAO, T.T; MAN, R.Y. 2006. Efficacy of different vasodilators on human umbilical arterial smooth muscle under normal and reduced oxygen conditions. *Early Hum Dev* 82(7):457-62.

LOVREN, F.; TRIGGLE, C. 2000. Nitric oxide and sodium nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *Br J Pharmacol* 131(3):521-9

MARI, G.; PICCONI, J. 2008. Doppler Vascular Changes in Intrauterine Growth Restriction. *Seminar in Perinatology* 32:182-189

MONTEZANO, A.C.; TOUYZ, R.M. 2014. Chapter 47: Reactive Oxygen Species, Vascular Disease, and Hypertension. **IN: LAHER, I.** *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 1123-1154

MORALES-ROSELLÓ, J.; LEÓN-MENDOZA, M.T. 2005. Study of abdominal circumference proportions in fetuses with growth disorders. *Arch Gynecol Obstet* 272(1):40-2

MUNIYAPPA, R.; MONTAGNANI, M.; KOH, K.K.; QUON, M.J. 2007. Cardiovascular actions of insulin. *Endocr Rev* 28(5):463-91

PARDI, G.; MARCONI, A.N.; CETIN, I. 2002. Placental-fetal Interrelationship in IUGR Fetuses—A Review. *Placenta* 23 (A), Trophoblast Research.

PROCTOR, L.K.; RUSHWORTH, V.; SHAH, P.S.; KEUNEN, J.; WINDRIM, R.; RYAN, G.; KINGDOM, J. 2010. Incorporation of femur length leads to underestimation of fetal weight in asymmetric preterm growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 35(4):442-8

SANTOS, J; FONSECA, E; VAN MELIS, J; MIGLINO M.A. 2014. Morphometric analysis of fetal development of *Cavia porcellus* (Linnaeus, 1758) by ultrasonography-pilot study. *Theriogenology* 15;81(7):896-900

SCHRÖDER, S.H. 2003. Models of fetal growth restriction. *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 110: S29–S39

SZIJÁRTÓ, I.A; MOLNÁR, G.A; MIKOLÁS, E.; FISI, V.; CSEH, J.; LACZY, B.; KOVÁCS, T.; BÖDDI, K.; TAKÁTSY, A.; GOLLASCH, M.; KOLLER A.; WITTMANN, I. 2014. Elevated vascular level of ortho-tyrosine contributes to the impairment of insulin-induced arterial relaxation. *Horm Metab Res* 46(11):749-52

TAYLOR. K.D; LEE. K.V. 2012. Chap. 25: Guinea Pigs as Experimental Models **IN:** *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents*, 1° Ed. American College of Laboratory Animal Medicine. pp. 705-709

THOMPSON, L.P; LIU, H; EVANS, L; MONG, J.A. 2011. Prenatal nicotine increases matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) expression in fetal guinea pig hearts. *Reproductive Sciences* 18:1103-10

TURAN, S.; TURAN, O.M.; SALIM, M.; BERG, C.; GEMBRUCH, U.; HARMAN, C.R; BASCHAT, A.A. 2013. Cardiovascular transition to extrauterine life in growth-restricted neonates: relationship with prenatal Doppler findings. *Fetal Diagn Ther* 33(2):103-9.

TURNER, A.J; TRUDINGER, B.J. 2000. Ultrasound measurement of biparietal diameter and umbilical artery blood flow in the normal fetal guinea pig. *Comp Med.* 50(4):379-84

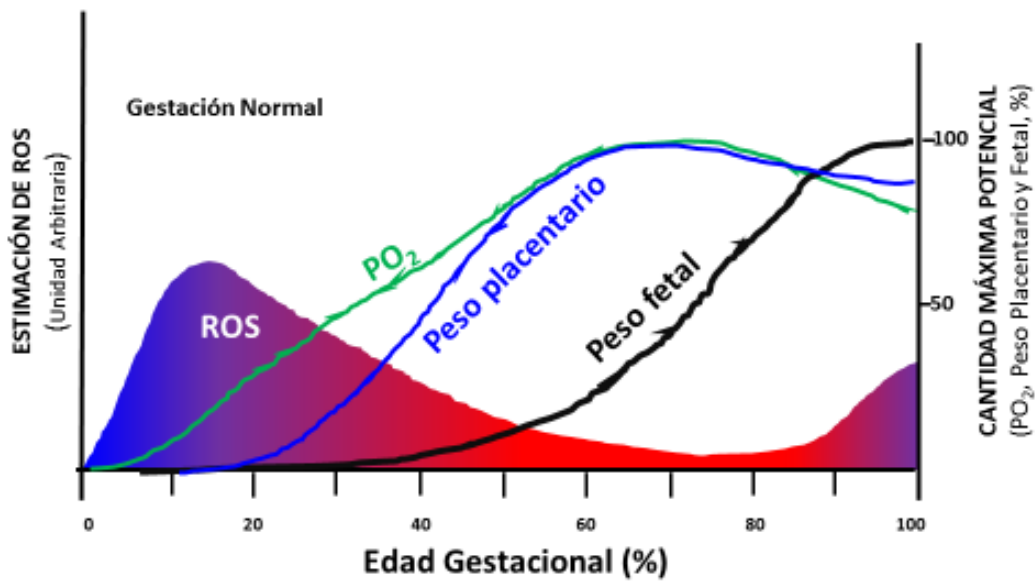
TURNER, A.J.; TRUDINGER, B.J. 2009. A Modification of the Uterine Artery Restriction Technique in the Guinea Pig Fetus Produces Asymmetrical Ultrasound Growth. *Placenta* 30:236–24

WARD, J.P.; SNETKOV, V.A. 2004. Determination of signaling pathways responsible for hypoxic pulmonary vasoconstriction: use of the small vessel myograph. *Methods in Enzymology* 381:71-87

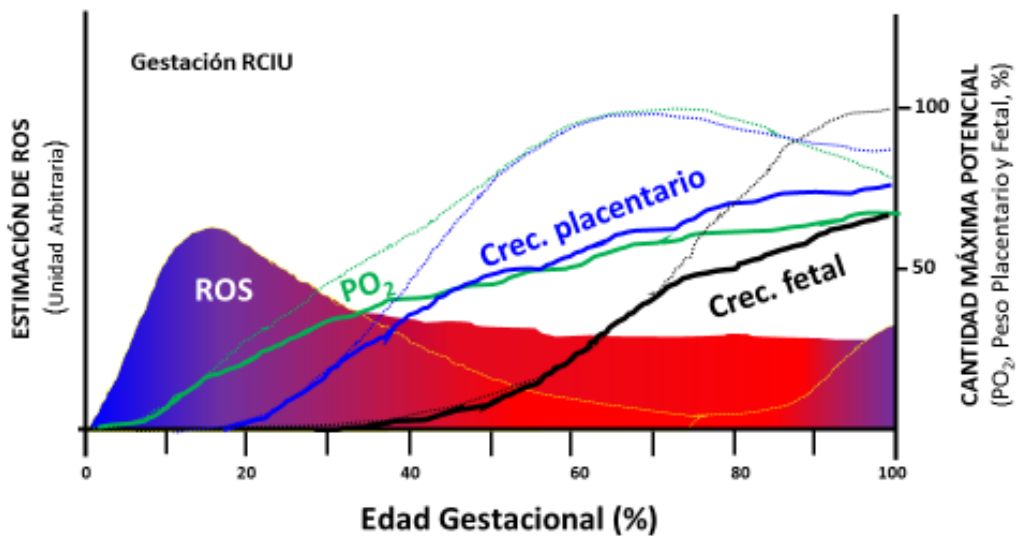
WAREING, M.; GREENWOOD, S.L. 2011. Review: Potassium channels in the human fetoplacental vasculature. *Placenta* 32 Suppl 2:S203-6.

YAO, L.; ROMERO, M.J; TOQUE, H.A; YANG, G.; CALDWELL, R.B; CALDWELL, R.W. 2010. The role of RhoA/Rho kinase pathway in endothelial dysfunction. *J Cardiovasc Dis Res* 1(4):165-70

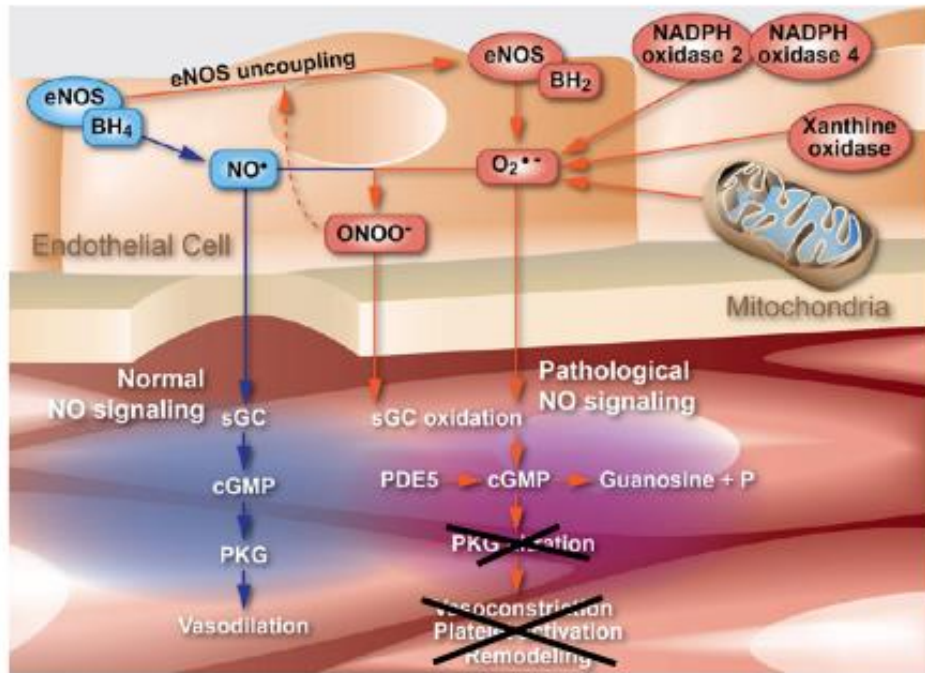
ANEXOS



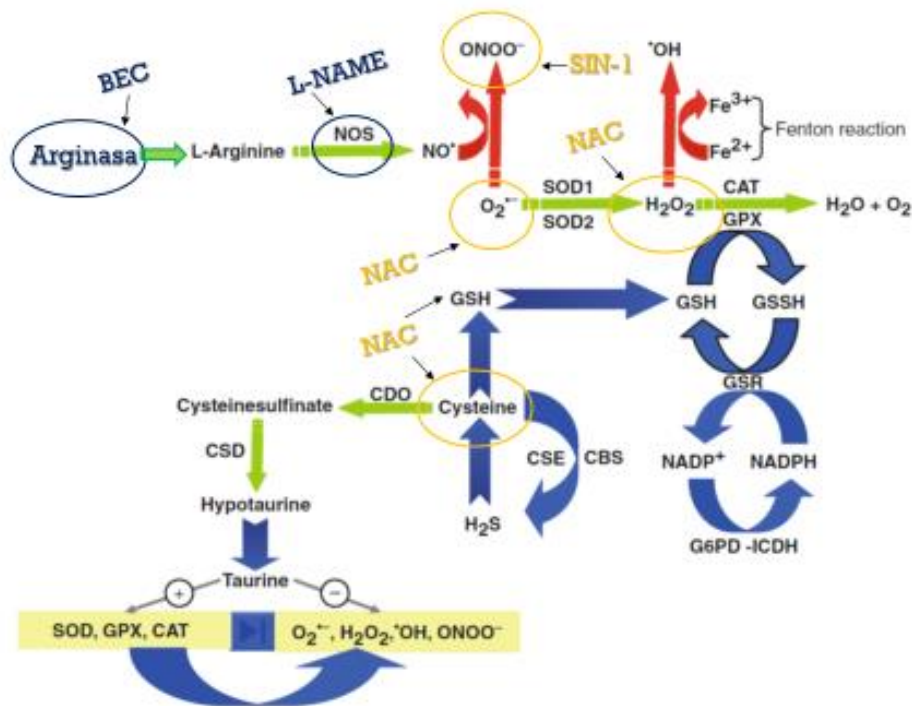
Modificado de HERRERA, *et al.* *Frontiers Pharmacol.* 5:149, 2014.



Modificado de HERRERA, *et al.* *Frontiers Pharmacol.* 5:149, 2014.



Modificado de Tabima et al. Free Radic Biol Med. 52(9):1970-86, 2012.



Modificado de Al Goubury, In: Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants, 2014



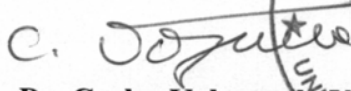
CERTIFICACIÓN


El Comité de Bioética Sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, certifica que en el Proyecto de Investigación titulado: **“Caracterización de la función vascular de un modelo de restricción de crecimiento intra-uterino por oclusión progresiva de arterias uterinas en cobayas”** cuyo Investigador Responsable es el **Dr. Emilio Herrera**, no se plantean acciones que contravengan las Normas Bioéticas Básicas de Manejo y Cuidados de los Animales a utilizar en los procedimientos experimentales planificados (Protocolo CBA 0694 FMUCH).

El Dr. Herrera, se ha comprometido a mantener los procedimientos experimentales planteados en el Protocolo de trabajo y a no realizar modificación alguna sin previa notificación y posterior aprobación por parte de este Comité.

Se otorga la presente certificación por **36** meses, tiempo estimado de la realización de este proyecto FONDECYT.

*El Comité de Bioética sobre Investigación en Animales de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile está constituido por 10 miembros con experiencia en el manejo y mantención de animales: 3 veterinarios, 6 académicos de diversas disciplinas y 1 persona ajena a la academia. El certificado que emite el Comité procede de la aprobación del “**PROTOCOLO DE MANEJO Y CUIDADOS DE ANIMALES DE LABORATORIO**” después de un estudio acucioso por sus miembros y de la acogida de los investigadores o jefes de Bioterios, de las observaciones exigidas por el Comité.*


Dr. Carlos Valenzuela
Presidente (S)
Comité de Bioética sobre Investigación en Animales



Santiago, 16 de Septiembre de 2014.