

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Fisiología**



**BIOMARCADORES PREDICTIVOS DEL DESARROLLO DE  
COMPLICACIONES MATERNAS Y FETALES.  
INFLUENCIA DEL ESTADO PSICOLÓGICO**

**TESIS DOCTORAL**

David Ramiro Cortijo

*Doctorado en Farmacología y Fisiología*

2018

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Fisiología de la Universidad Autónoma de Madrid. Financiada por el Ministerio de Economía y Competitividad en su convocatoria del Plan Nacional (FEM2015-63631-R) y por la Universidad Autónoma de Madrid en su segunda convocatoria de proyectos de investigación multidisciplinar (CEMU-2013-10).

# *Agradecimientos*

*A mi familia*

*En especial, a mis abuelos*

*Se concluye una etapa en mi vida y parece mentira que sea así. Me gustaría empezar estas páginas agradeciendo a quienes han hecho posible que sean escritas.*

*En primer lugar, mi madre quién me inculcó esa curiosidad por la biomedicina desde bien pequeño, mi padre quién me transmitió que con trabajo constante se pueden lograr grandes cosas y mi hermana pequeña (la única que tengo) por los abrazos que me da sin que se los pida y los que me da cuando los necesito. En definitiva, mi familia, mis abuelas Paula y María, cuánta falta hacéis y que poco tiempo se os dedica, mis abuelos Modesto y Paco, que sin estar presentes siguen estando; mis tíos: José, Antonio, Javi, Juan, Basi y Mónica, gracias por los cumpleaños, las películas, las obras de teatro, los viajes y las búsquedas al aeropuerto. A mis primos: Oscar, Raúl, Javier, Aurora y la nueva adquisición, Irene. No sería quien soy sin mi familia; simplemente, GRACIAS.*

*To you, Richard Torres, it is not easy to thank or summarize in a few lines so many emotions. Thanks for showing me what seems impossible sometimes only takes a little time, that the good are never easy. Thanks for sushi, the mofongo, for the NYC, WDC and the Yunque, for the thanksgiving and support in my roller coasters. Would it be only to say THANK YOU?*

*En estos años, he pasado muchas horas entre reactivos, animales, probetas, pacientes, incluso placentas... eso hace que se genere otro tipo de familia a la que también necesito agradecer que este trabajo haya salido adelante. Dra. Silvia M. Arribas, Dr. Ángel Luis López de Pablo y Prof<sup>a</sup>. M<sup>a</sup> del Carmen González, en definitiva, Silvia, Ángel Luis y Maricarmen quiénes desde el principio confiaron en mí, me acogieron en su laboratorio y me enseñaron tanto. GRACIAS por Navacerrada, por los cafés de la mañana, por dejarme superar los miedos a volar (no sé si del todo...), las oportunidades y la calidad humana. Pero en esta misma línea, me gustaría dar las GRACIAS al Departamento de Fisiología por la pedagogía enseñada y los buenos momentos, GRACIAS. Fuera del módulo C también hay gente que quiero recordar, Dra. M<sup>a</sup> Rosario López, Charo, mi vademécum-estadístico; Dr. Javier Regadera, gran patólogo y persona (aunque sin pelos en la lengua); Dra. Maria del Mar Pérez, Mar; Dra. M<sup>a</sup> Jesús García, Dr. Rafael Martínez, Rafa. Conchi, Toño, Cipri, Soco... nuevamente GRACIAS.*

*Un sentimiento especial es el que me gustaría transmitir a mis compis (a mis amig@s del labo) Pilar, Perla, Cynthia, Jose Luis, César, Sara. Sin duda, este trabajo no sería lo que es sin ellos. Los cumpleaños, los desayunos y comidas (incluso cenas), los taKos, la viuda, los paseos por Alcalá, las caídas, las esperas en urgencias, los congresos... en fin, un "GRACIAS" se me quedaría corto.*

*Desde la Facultad de Psicología, Prof. Bernardo Moreno y Dra. Eva Garrosa, el equipo HULP, desde ginecología, Dra. María de la Calle, pasando por el Sº de análisis clínico, Dr. Rubén Gómez hasta enfermería. El equipo HGUGM, Dra. Begoña Quintana. Muchísimas GRACIAS a tod@s.*

*No puedo dejar de agradecer las colaboraciones que me han permitido aprender nuevas técnicas. El equipo CIAL: Dra. Mª Ángeles Martín, Dra. Yolanda Aguilera, Miguel Rebollo, tan necesarios (creo que como mejor gracias a vosotros). El equipo CEU: Dra. Beatriz Somoza, Dra. Marta Gil (junto con Mª Carmen, GRACIAS por la miografía de presión). El equipo de la Dra. Eva Cano en el ISCIII, que me permitió conocer la inflamación desde dentro (concretamente desde el ARN). No me podía olvidar de quienes me acogieron tan gratamente al otro lado del charco, el equipo IBBA: Dr. Salinas, Dra. Carla Murillo, Dr. González, Dra. Catherine Romero, Zaida, quienes me enseñaron lo fácil de una gasometría arterial y lo difícil de una espirometría funcional (a veces, incluso imposible).*

*I would like to dedicate some very special lines to BIDMC team: Dr. Steven D. Freedman and Dr. Camilia R. Martin, I don't know how I could THANK YOU, I will be eternally grateful for the professionalism and human quality that I received. Dr. George Perides to understand my English and still help me, Joanne Brown for your patience, Dr. Xinting Yu for your statistics and search capacity, Dr. Pratibha Singh, Michel Perillo, Hilda, Evelyn, Laddy, Pedro, Ece, Jil... for your friendship; sincerely, THANKS to everyone.*

*GRACIAS a vosotras: Andrea, por esos Gordix®; Marta, increíble cómo pasa el tiempo; Arancha, aun en las antípodas; Vero, por tantos y tantos campos; Rosa, por ponerme los pies en la tierra; Rocío, mi referente en la educación. Personas que sin querer-queriendo han sido capaces de aguantarme durante la tesis y mostrarme su apoyo incondicional.*

[...]

*No te rindas que la vida es eso,  
continuar el viaje,  
perseguir tus sueños,  
destrabar el tiempo,  
correr los escombros y destapar el cielo.*

[...] *No te rindas - Mario Benedetti*

*A tod@s,*

*¡MUSCHAS GRACIAS!*

# ÍNDICE

<b>Abreviaturas</b> .....	<b>14</b>
<b>RESUMEN / ABSTRACT</b> .....	<b>17</b>
<b>Capítulo I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>24</b>
<b>1. Aspectos sociales de la maternidad</b> .....	<b>25</b>
1.1. <i>El retraso en la edad de maternidad</i> .....	25
1.2. <i>Gestación y estilos de vida</i> .....	28
1.3. <i>Aspectos nutricionales en la gestación</i> .....	29
1.4. <i>El sueño y su relación con la gestación</i> .....	31
<b>2. Aspectos biológicos de la gestación</b> .....	<b>32</b>
2.1. <i>Complicaciones maternas y fetales durante la gestación</i> .....	32
2.2. <i>Embarazos de alto riesgo</i> .....	36
2.3. <i>Balance oxidativo durante la gestación</i> .....	37
2.3.1. <i>Balance oxidativo</i> .....	37
2.3.2. <i>Estrés oxidativo y patología obstétrica</i> .....	40
2.4. <i>Hormonas</i> .....	42
2.5. <i>Citoquinas</i> .....	44
<b>3. Aspectos psicológicos de la maternidad</b> .....	<b>46</b>
3.1. <i>Las técnicas de reproducción asistida y sus procesos emocionales</i> .....	49
<b>Capítulo II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS / HYPOTHESES AND OBJECTIVES</b>	<b>50</b>
<b>1. Justificación del estudio / Rationale of study</b> .....	<b>51</b>
<b>2. Hipótesis y objetivos / Hypotheses and objectives</b> .....	<b>52</b>
<b>Capítulo III. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	<b>55</b>
<b>1. Población de estudio</b> .....	<b>56</b>
1.1. <i>Datos clínico-obstétricos</i> .....	57
<b>2. Cuestionarios sociodemográficos, nutricional, de estilos de vida y de percepción del sueño</b> .....	<b>59</b>
<b>3. Extracción de sangre y su análisis</b> .....	<b>60</b>
3.1. <i>Bioquímica y hematología</i> .....	60
3.2. <i>Determinación de antioxidantes plasmáticos</i> .....	60
3.2.1. <i>Determinación de la actividad de captación de O<sub>2</sub><sup>-</sup> (SOSA)</i> .....	61
3.2.2. <i>Determinación de la actividad catalasa</i> .....	62
3.2.3. <i>Determinación de glutatión reducido (GSH)</i> .....	63
3.2.4. <i>Determinación de grupos tioles</i> .....	65
3.2.5. <i>Determinación de compuestos fenólicos</i> .....	65
3.3. <i>Determinación de daño oxidativo plasmático</i> .....	67
3.3.1. <i>Medida de Malondialdehído (MDA)</i> .....	67
3.3.2. <i>Medida de grupos carbonilos</i> .....	68
3.4. <i>Cálculo para determinar de índices (Scores)</i> .....	69
3.5. <i>Determinación de hormonas en plasma</i> .....	71

3.5.1. Determinación de melatonina.....	71
3.5.2. Determinación de cortisol.....	72
3.6. <i>Determinación de citoquinas</i> .....	73
<b>4. Aplicaciones psicológicas</b> .....	<b>75</b>
4.1. <i>Escala de afectividad negativa y positiva</i> .....	75
4.2. <i>Escala hospitalaria de ansiedad y escala hospitalaria de depresión</i> .....	76
4.3. <i>Escala de preocupaciones durante el embarazo</i> .....	76
4.4. <i>Escala de optimismo disposicional</i> .....	76
4.5. <i>Escala de satisfacción vital</i> .....	76
4.6. <i>Escala de recursos generales</i> .....	77
4.7. <i>Escala de resiliencia</i> .....	77
4.8. <i>Escala de conciliación del ámbito laboral y personal</i> .....	77
<b>5. Análisis estadístico</b> .....	<b>79</b>
Capítulo IV. <b>RESULTADOS</b>	<b>80</b>
<b>1. Características generales de la población</b> .....	<b>81</b>
<b>2. Complicaciones maternas y fetales</b> .....	<b>83</b>
2.1. <i>Complicaciones maternas y fetales en función de las características sociales</i> .....	86
2.2. <i>Complicaciones maternas y fetales en función del estilo de vida</i> .....	86
2.3. <i>Complicaciones maternas y fetales en función de los hábitos nutricionales</i> .....	87
<b>3. Parámetros biológicos</b> .....	<b>88</b>
3.1. <i>Parámetros biológicos en función de las complicaciones maternas y fetales</i> .....	88
3.1.1. Parámetros bioquímicos y hematológicos.....	88
3.1.2. Biomarcadores del estado oxidativo plasmático.....	91
3.1.2.1. Antioxidantes.....	91
3.1.2.2. Biomarcadores de daño oxidativo.....	94
3.1.3. Hormonas.....	97
3.1.4. Citoquinas.....	99
3.2. <i>Parámetros biológicos en función del tipo de gestación y tipo de reproducción</i> .....	101
3.2.1. Parámetros bioquímicos y hematológicos.....	101
3.2.2. Biomarcadores del estado oxidativo plasmático.....	103
3.2.2.1. Antioxidantes.....	103
3.2.2.2. Biomarcadores de daño oxidativo.....	105
3.2.3. Hormonas.....	106
3.2.4. Citoquinas.....	107
<b>4. Características psicológicas</b> .....	<b>108</b>
4.1. <i>Características psicológicas en función de las complicaciones maternas y fetales</i> .....	111
4.1.1. Escala de afectividad negativa/positiva.....	111
4.1.2. Escala hospitalaria de ansiedad.....	112
4.1.3. Escala de preocupaciones durante el embarazo.....	112
4.1.4. Escala de optimismo disposicional.....	113
4.1.5. Escala de satisfacción vital.....	114
4.1.6. Escala de recursos generales.....	115
4.1.7. Escala de resiliencia.....	115

4.1.8. Escala de conciliación del ámbito laboral y personal.....	116
4.1.9. Escala hospitalaria de depresión.....	116
4.2. <i>Características psicológicas en función del tipo de gestación y tipo de reproducción.....</i>	117
4.2.1. Escala de afectividad negativa/positiva.....	117
4.2.2. Escala hospitalaria de ansiedad.....	118
4.2.3. Escala de preocupaciones durante el embarazo.....	118
4.2.4. Escala de optimismo disposicional.....	119
4.2.5. Escala de satisfacción vital.....	119
4.2.6. Escala de recursos generales.....	120
4.2.7. Escala de resiliencia.....	120
4.2.8. Escala de conciliación del ámbito laboral y personal.....	121
4.2.9. Escala hospitalaria de depresión.....	121
<b>Capítulo V. DISCUSIÓN</b>	<b>123</b>
1. <b>El patrón de la maternidad actual.....</b>	<b>124</b>
2. <b>Embarazos de alto riesgo y patologías materno-fetales.....</b>	<b>129</b>
3. <b>Aspectos biológicos y su impacto en la gestación.....</b>	<b>131</b>
3.1. <i>Bioquímica y hematología.....</i>	131
3.2. <i>Biomarcadores del estado oxidativo plasmático.....</i>	133
3.3. <i>Hormonas.....</i>	138
3.4. <i>Citoquinas.....</i>	141
4. <b>Evolución de los aspectos psicológicos implicados en la gestación.....</b>	<b>143</b>
<b>Capítulo VI. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS</b>	<b>146</b>
<b>Capítulo VII. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>151</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>170</b>
1. <b>Escala psicológicas empleados en esta Tesis Doctoral.....</b>	<b>171</b>
1.1. <i>Escala de afectividad negativa y positiva.....</i>	171
1.2. <i>Escala hospitalaria de ansiedad y escala hospitalaria de depresión.....</i>	172
1.3. <i>Escala de preocupaciones durante el embarazo.....</i>	174
1.4. <i>Escala de optimismo disposicional.....</i>	175
1.5. <i>Escala de satisfacción vital.....</i>	176
1.6. <i>Escala de recursos generales.....</i>	177
1.7. <i>Escala de resiliencia.....</i>	178
1.8. <i>Escala de conciliación del ámbito laboral y personal.....</i>	179
2. <b>Publicaciones y capítulo derivados de esta tesis doctoral.....</b>	<b>180</b>



Pag. **ÍNDICE de FIGURAS**

- 25 **Figura 1.** Edad de primera maternidad y tasa de natalidad en España, entre 2009 y 2016
- 27 **Figura 2.** Fecundidad en España en mujeres de 25 y 30 años de edad, entre los años 2009-2016
- 27 **Figura 3.** Mujeres tratadas con fecundación in vitro entre 2009 y en 2015 en España, en función de la edad al inicio del tratamiento
- 35 **Figura 4.** Representación gráfica de los valores de peso al nacer neonatal según su edad gestacional y sexo
- 39 **Figura 5.** Balance oxidativo (**A**) y estrés oxidativo (**B**) en los sistemas biológicos
- 41 **Figura 6.** Consecuencias sobre la salud gestacional de los posibles cambios en los sistemas antioxidantes al inicio de la gestación
- 47 **Figura 7.** Asociación entre el estrés materno y el estrés fetal
- 51 **Figura 8.** Factores psicosociales y biológicos durante la gestación que afectan a la salud materno-fetal
- 56 **Figura 9.** Esquema de la temporalidad en la recogida de datos/muestras para las distintas mujeres que aceptaron participar en el estudio
- 62 **Figura 10.** Protocolo experimental para el método SOSA (*Superoxide Anion Scavenging Activity*)
- 63 **Figura 11.** Protocolo experimental para la determinación de actividad catalasa de las muestras
- 64 **Figura 12.** Protocolo experimental para la determinación de glutatión reducido (GSH) de las muestras
- 65 **Figura 13.** Protocolo experimental para la determinación de grupos tioles de las muestras
- 66 **Figura 14.** Protocolo experimental para la determinación de compuestos fenólicos tras la precipitación de ácidos grasos y proteínas de las muestras
- 67 **Figura 15.** Protocolo experimental para la determinación de malondialdehído (MDA)
- 69 **Figura 16.** Protocolo experimental para la determinación de proteínas carboniladas totales
- 72 **Figura 17.** Protocolo experimental para la determinación de melatonina plasmática tras la purificación de las muestras por SPE-manifold
- 73 **Figura 18.** Metodología de microarrays para la cuantificación de citoquinas inflamatorias
- 74 **Figura 19.** Protocolo experimental para la determinación de citoquinas inflamatorias por microarrays
- 82 **Figura 20.** Distribución de la población según el tipo de reproducción (**A**) y según el tipo de gestación (**B**)
- 84 **Figura 21.** Distribución de complicaciones maternas o fetales en función del tipo de reproducción
- 84 **Figura 22.** Complicaciones fetales en función del tipo de gestación
- 85 **Figura 23.** Pesos de los recién nacidos en función de las complicaciones maternas o fetales
- 91 **Figura 24.** Actividad SOD y catalasa en función de las complicaciones maternas (**A**) y complicaciones fetales (**B**)
- 92 **Figura 25.** Nivel de glutatión (GSH), tioles y de fenoles en función de las complicaciones maternas (**A**) o fetales (**B**)

- 93 Figura 26.** Capacidad antioxidante total (Antiox-S) en plasma, en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B)
- 94 Figura 27.** Relación entre consumo de frutas y verduras y los niveles de compuestos fenólicos en plasma (A) y relación entre el consumo de verduras, estado antioxidante global en plasma (Antiox-S) e IL-10 en plasma (B)
- 94 Figura 28.** Niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) en función de las complicaciones maternas (A) o fetales (B)
- 95 Figura 29.** Niveles de proteínas carboniladas en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B)
- 96 Figura 30.** Daño oxidativo global (Prooxy-S) en plasma en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B)
- 96 Figura 31.** Puntuaciones del balance oxidativo global (Global-S) en plasma, en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B)
- 97 Figura 32.** Niveles diurnos de melatonina plasmática en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B)
- 98 Figura 33.** Niveles plasmáticos de cortisol en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B)
- 99 Figura 34.** Niveles plasmáticos de melatonina y cortisol en función de la eficacia del sueño (A) o de la satisfacción del sueño (B)
- 100 Figura 35.** Niveles plasmáticos de IL-10 e IL-8 en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B)
- 104 Figura 36.** Capacidad antioxidante total (Antiox-S) en plasma, en función del tipo de gestación (A) o del tipo de reproducción (B)
- 106 Figura 37.** Niveles diurnos de melatonina plasmática en función del tipo de gestación (A) o del tipo de reproducción (B)
- 106 Figura 38.** Niveles plasmáticos de cortisol en función del tipo de gestación (A) o del tipo de reproducción (B)
- 117 Figura 39.** Escala de afectividad negativa y positiva en función del tipo de gestación (A) y el tipo de reproducción (B)
- 118 Figura 40.** Puntuaciones en la escala hospitalaria de ansiedad en función del tipo de gestación (A) y el tipo de reproducción (B)
- 118 Figura 41.** Puntuaciones en la escala de preocupaciones durante el embarazo en función del tipo de gestación (A) y el tipo de reproducción (B)
- 121 Figura 42.** Puntuaciones en la escala hospitalaria de depresión en función del tipo de gestación (A) y del tipo de reproducción (B)

Pag. **ÍNDICE de TABLAS**

- 44 Tabla 1.** Citoquinas pro y antiinflamatorias cuantificadas en este trabajo
- 75 Tabla 2.** Distribución temporal de las escalas psicológicas aplicadas en este trabajo
- 78 Tabla 3.** Escalas psicológicas empleadas en este trabajo
- 85 Tabla 4.** Peso del recién nacido en función de las complicaciones maternas y fetales
- 86 Tabla 5.** Complicaciones maternas y fetales en función de las características sociales
- 86 Tabla 6.** Complicaciones maternas y fetales en función de los estilos de vida
- 87 Tabla 7.** Complicaciones maternas y fetales en función de los hábitos nutricionales
- 89 Tabla 8.** Parámetros bioquímicos en función de complicaciones maternas o fetales
- 90 Tabla 9.** Parámetros hematológicos en función de las complicaciones maternas o fetales
- 99 Tabla 10.** Niveles de citoquinas plasmáticas en función del desarrollo de complicaciones maternas o fetales
- 101 Tabla 11.** Parámetros bioquímicos en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción
- 102 Tabla 12.** Parámetros hematológicos en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción
- 103 Tabla 13.** Antioxidantes enzimáticos en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción
- 103 Tabla 14.** Antioxidantes de bajo peso molecular en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción
- 105 Tabla 15.** Daño oxidativo a lípidos y proteínas en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción
- 107 Tabla 16.** Niveles de citoquinas en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción
- 108 Tabla 17.** Análisis descriptivo global de las variables psicológicas
- 110 Tabla 18.** Correlaciones entre las variables psicológicas estudiadas en este trabajo
- 111 Tabla 19.** Puntuaciones en la escala de afectividad negativa/positiva en función de las complicaciones maternas y fetales
- 112 Tabla 20.** Puntuaciones en la escala hospitalaria de ansiedad en función de las complicaciones maternas y fetales
- 113 Tabla 21.** Puntuaciones en la escala de preocupaciones durante el embarazo en función de complicaciones maternas y fetales
- 113 Tabla 22.** Puntuaciones en la escala de optimismo disposicional en función de las complicaciones maternas y fetales
- 114 Tabla 23.** Puntuaciones en la escala de satisfacción vital en función de las complicaciones maternas y fetales
- 115 Tabla 24.** Puntuaciones en la escala de recursos generales en función de complicaciones maternas y fetales
- 115 Tabla 25.** Puntuaciones en la escala de resiliencia en función de las complicaciones maternas y fetales
- 116 Tabla 26.** Puntuaciones en la escala de conciliación del ámbito laboral y personal en función de las complicaciones maternas y fetales

- 116 Tabla 27.** Puntuaciones en la escala hospitalaria de depresión en función de las complicaciones maternas y fetales
- 119 Tabla 28.** Puntuaciones en la escala de optimismo disposicional en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción
- 119 Tabla 29.** Puntuaciones en la escala de satisfacción vital en función del tipo de gestación y el tipo de reproducción
- 120 Tabla 30.** Puntuaciones en la escala de recursos generales en función del tipo de gestación y el tipo de reproducción
- 120 Tabla 31.** Puntuaciones en la escala de resiliencia en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción
- 121 Tabla 32.** Puntuaciones en la escala de conciliación del ámbito laboral y personal en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción
- 122 Tabla 33.** Modelo de regresión tomando como variable criterio el peso del recién nacido

# *Abreviaturas*

- OH.** Radical hidroxilo
- 11β-HSD2.** 11 beta-hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
- ADN.** Ácido desoxirribonucleico
- ALA-T.** Alanina transferasa
- ANOVA.** Análisis de la varianza
- Antiox-S.** Estado antioxidante global en plasma
- BSA.** Albumina de suero bovino
- CIR.** Crecimiento intrauterino retardado
- CO<sub>2</sub>.** Dióxido de carbono
- CRH.** Corticotropina
- CTA.** Coelenteramida
- CTZ.** Coelenterazina
- DMG.** Diabetes gestacional
- DNPH.** 2,4-Dinitrofenilhidrazona
- DTNB.** Ácido-5,5'-ditiobis-2-nitrobenzólico
- EDTA.** Ácido etilendiaminotetracético
- EGTA.** Ácido egtácico
- ELISA.** Enzyme-Linked Immune Sorbent Assay
- FIV.** Fecundación *in vitro*
- GAE.** Ácido gálico
- Global-S.** Balance oxidativo plasmático global
- GSH.** Glutation reducido
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** Peróxido de hidrógeno
- HADS.** The hospital anxiety and depression scale
- hCG.** Hormona gonadotropica coriónica humana
- hPL.** hormona lactógeno de la placenta
- HRP.** Peroxidasa de rábano
- HTG.** Hipertensión gestacional
- HULP.** Hospital Universitario La Paz
- ICSI.** Inyección intracitoplasmática de espermatozoides
- IL.** Interleuquina
- IMC.** Índice de Masa Corporal

**INE.** Instituto Nacional de Estadística

**LOT.** Life orientation test

**MCP-1.** Proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1

**MDA.** Malondialdehído

**NO.** Óxido Nítrico

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.** Radical anión superóxido

**OMS.** Organización Mundial de la Salud

**ONOO<sup>•</sup>.** Radical peroxinitrito

**OPT.** O-Ftaldehído

**PANAS.** Positive and negative affect shedule

**PBS.** Tampón fosfato salino

**PCT.** Proteínas carboniladas totales

**PE.** Preeclamsia

**Prooxy-S.** Daño oxidativo plasmático global

**RNS.** Reactive Nitrogen Species

**ROO<sup>•</sup>.** Radical peroxilo

**ROS.** Reactive Oxygen Species

**SDS.** Dodecil sulfato sódico

**SOD.** Superóxido Dismutasa

**SOSA.** Superoxide Anion Scavenging Activity

**TBA.** Ácido 2-tiobarbitúrico

**TCA.** Ácido tricloroacético

**TNF- $\alpha$ .** Factor de necrosis tumoral  $\alpha$

**TRA.** Técnicas de Reproducción Asistida

**TSH.** Hormona estimulante de la tiroides

**XOD.** Xantina oxidasa

*Resumen*

*Abstract*



## Resumen

**Introducción.** Los cambios actuales en la sociedad de países de nuestro entorno han modificado el patrón de maternidad, evidenciándose un retraso en la edad de gestación. Una de las consecuencias más relevantes de este retraso es el aumento de complicaciones maternas -preeclamsia (PE), hipertensión gestacional (HTG) o diabetes (DMG)- y fetales -crecimiento intrauterino retardado (CIR) o prematuridad-. Además, se ha incrementado el uso de técnicas de reproducción asistida (TRA), lo que conlleva una mayor incidencia de gestaciones gemelares, que también son consideradas de alto riesgo. Mujeres que han desarrollado una patología obstétrica, presentan alterados algunos parámetros plasmáticos a partir de las semana 20 de gestación. Sin embargo, no se conoce si estos parámetros podrían ser biomarcadores tempranos, que permitieran un diagnóstico precoz de alguna patología materno-fetal. Junto con los factores biológicos que pueden predisponer a la gestante al desarrollo de una complicación, existen factores psicológicos que pueden modular el resultado obstétrico. Estos aspectos psicológicos pueden ser de mayor relevancia en el contexto actual de la maternidad en el que, al estrés del embarazo se añade la incertidumbre derivada del uso de TRA y los problemas de conciliación laboral y personal.

**Hipótesis y Objetivos.** Esta Tesis plantea la hipótesis de que existen biomarcadores plasmáticos que, al inicio de la gestación, pueden ayudar al diagnóstico del desarrollo de una complicación materna o fetal. Estos parámetros biológicos están modulados por aspectos psicológicos. Para evaluar esta hipótesis se ha estudiado una población de embarazadas sanas al inicio de la gestación, planteándose los siguientes objetivos: 1) evaluar el contexto social de la maternidad actual y su influencia en los parámetros clínico-obstétricos; 2) determinar posibles biomarcadores tempranos de complicaciones materno-fetales; 3) estudiar la evolución del patrón psicológico y su relación con parámetros biológicos, clínico-obstétricos y el uso de TRA.

**Material y Métodos.** Se reclutaron 200 mujeres embarazadas atendidas en el servicio de Ginecología y Obstetricia del hospital universitario la Paz (Madrid-España), donde se realizó su seguimiento clínico-obstétrico, analizando el uso de TRA, si presentaban embarazos gemelares, el desarrollo de complicaciones maternas o fetales y el peso de

los neonatos. En la semana 9 de gestación las mujeres respondieron a cuestionarios sociodemográficos, nutricionales, de estilo de vida y percepción del sueño y se obtuvo una muestra de sangre para la determinación de los parámetros hematológicos de rutina y de biomarcadores plasmáticos. Se evaluaron biomarcadores de daño oxidativo (grupos carbonilos y malondialdehído-MDA), antioxidantes (actividad superóxido dismutasa, catalasa, glutatión reducido, grupos tioles y compuestos fenólicos) por espectrofotometría/fluorimetría; a partir de estos datos se calcularon los índices de estado antioxidante (Antiox-S), pro-oxidante (Prooxy-S) y el estado oxidativo global (Global-S). Los niveles de melatonina se evaluaron por ELISA y los niveles de citoquinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8 e IL-10) por microarrays. La evolución en los rasgos psicológicos fue evaluada en los tres trimestres de gestación, contemplando afectividad negativa y positiva, ansiedad, depresión, preocupaciones durante el embarazo, optimismo, satisfacción vital, resiliencia, recursos generales y conciliación del ámbito laboral y personal. El análisis estadístico incluyó las pruebas T de Student, U de Mann-Whitney,  $\chi^2$ , las correlaciones de Pearson o Spearman, los análisis de correspondencia o univariante (ANOVA), los modelos lineales de medidas repetidas y de regresión. Se consideró significancia estadística  $p < 0.05$ . El análisis estadístico fue realizado mediante el paquete estadístico SPSS v.24.

**Resultados.** Los parámetros sociodemográficos y de estilo de vida indicaron que la población tenía un alto nivel sociocultural y una edad media de  $34.4 \pm 0.5$  años, que fue superior en las mujeres con TRA. Un 51.8% de la población tuvo gestaciones gemelares, la mayoría derivados de TRA. Las gestantes mantenían una dieta adecuada, suplementándose con ácido fólico el 99.4% y con polivitamínicos el 88.9%. Un 15.9% de la población fumaba durante la gestación y un 40.4% consumía alcohol. El 53.3% de las mujeres desarrolló alguna complicación materna, siendo HTG=2.2%, PE=4.9% y DMG=6%; se evidenció un 8.8% de CIR y un 25.1% de prematuridad. Ninguno de los parámetros sociales o de estilo de vida tuvo relación en el desarrollo posterior de una complicación materna o fetal. En relación a los parámetros bioquímicos, un nivel elevado de triglicéridos se asoció con el desarrollo de complicaciones tanto maternas como fetales y la elevación de ácido úrico con complicaciones maternas. Se consideró que los índices de estado oxidativo eran más robustos que los parámetros individuales

para predecir complicaciones gestacionales, encontrándose que los índices Antiox-S y Global-S estaban disminuidos en las mujeres que desarrollaron complicaciones maternas y fetales, respectivamente. Se encontró que unos niveles menores de citoquinas IL-10 e IL-8 al inicio de la gestación, se asociaron con el desarrollo de complicaciones fetales. Las gestantes con niveles de cortisol más altos desarrollaron complicaciones fetales. En cuanto a los aspectos psicológicos, se evidenció que las mujeres con TRA y con gestaciones gemelares, puntuaban más alto en escalas de afectividad negativa, problemas de conciliación laboral y personal y ansiedad. Además, estas mujeres presentaron niveles altos de cortisol y neonatos de menor peso. También se obtuvieron correlaciones positivas entre los niveles de leucocitos y las puntuaciones en diversas escalas emocionales negativas.

**Conclusiones.** 1) El aumento en la edad de maternidad, a consecuencia de cambios sociales, influye de forma negativa sobre la salud materna y fetal, incluso en poblaciones de alto nivel socioeconómico, cultural y con una nutrición adecuada. 2) Para predecir el desarrollo de una patología materno-fetal pueden ser utilizados los siguientes parámetros plasmáticos: a) triglicéridos y ácido úrico, b) índices del estado oxidativo, c) leucocitos e IL-8. Para confirmar su validez como biomarcadores, estos parámetros deberían ser analizados en una población más amplia. 3) El patrón psicológico de la madre durante la gestación influye en los parámetros biológicos y clínico-obstétricos, sobre todo en el peso del recién nacido, siendo particularmente relevante en el contexto de las TRA.

**Abstract**

**Introduction.** Maternity patten has recently changed in countries of our socioeconomic area, due to social changes, being the result an increase in the age of first pregnancy. One of the most relevant consequences of the delay in maternity is the increase in obstetric complications, either maternal - pre-eclampsia (PE), gestational hypertension (GHT) or gestational diabetes (GDM) - or fetal – intrauterine growth retardation (IUGR) or prematurity. In addition, the use of assisted reproduction techniques (ART) has increased, which entails a higher incidence of twin gestations, which are also considered as high risk pregnancies. Women who have developed an obstetric pathology exhibit alterations in some plasma parameters, detectable after around the 20th week of gestation. However, it is not known if these parameters are present at earlier stages of pregnancy and could be used as biomarkers for the early diagnosis of maternal-fetal complications. Along with the biological factors that can predispose to the development of a complication during pregnancy, there are psychological factors that can modulate the obstetric outcome. Maternal psychological aspects may be particularly relevant in the current context of maternity; in addition to the stress derived from the situation of pregnancy, the uncertainty derived from the use of TRA and the problems of work-life balance might participate in a worse pregnancy outcome.

**Hypothesis and Objectives.** This thesis raises the hypothesis that there are plasma biomarkers detectable at the beginning of gestation, which can be used as early diagnostic tools of the development of a maternal or a fetal complication. We also propose that biological parameters and obstetric outcome are modulated by psychological aspects. To evaluate this hypothesis, a population of healthy pregnant women at the beginning of pregnancy was studied and followed until delivery, considering the following objectives: 1) to evaluate the social context of current maternity and its influence on the clinical-obstetric parameters; 2) determine possible early biomarkers of maternal-fetal complications; 3) to study the evolution of the psychological pattern and its relation with biological, clinical-obstetric parameters and the influence of the use of TRA.

**Material and Methods.** A total of 200 pregnant women were recruited in the Obstetrics and Gynecology Department of University Hospital La Paz (Madrid-Spain), where their clinical-obstetric follow-up was performed, analyzing the use of ART, if they had twin pregnancies, the development of maternal or fetal complications and the weight of the neonates. At 9 week of pregnancy, women responded to sociodemographic, nutritional, lifestyle and sleep perception questionnaires and a blood sample was obtained for the determination of routine hematological parameters and plasma biomarkers. Biomarkers of oxidative damage (carbonyls and malondialdehyde-MDA groups), antioxidants (superoxide dismutase, catalase, reduced glutathione, thiol groups and phenolic compounds) were evaluated by spectrophotometry / fluorimetry; from these data the scores of antioxidant status (Antiox-S), pro-oxidant (Prooxy-S) and the global oxidative state (Global-S) were calculated. Melatonin levels were evaluated by ELISA and cytokine levels (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-8 and IL-10) by microarrays. The evolution in psychological traits was evaluated in the three trimesters of pregnancy, assessing negative and positive affectivity, anxiety, depression, worries during pregnancy, optimism, life satisfaction, resilience, general resources and work-life balance. Statistical analysis included Student's T-test, Mann-Whitney U test,  $\chi^2$ , Pearson or Spearman correlations, correspondence or univariate analysis (ANOVA), linear models of repeated measures and regression. Statistical significance was considered at  $p < 0.05$ . The statistical analysis was performed using the statistical package SPSS v.24.

**Results.** The sociodemographic and lifestyle parameters indicated that the population had a high sociocultural level; pregnant women had an average age of 34.4 $\pm$ 0.5 years, which was higher in women using ART. 51.8% of the population had twin gestations, the majority derived from ART. Pregnant women maintained an adequate diet; 99.4% of them used folic acid and 88.9% polyvitamins as supplements; 15.9% of the population smoked during pregnancy and 40.4% consumed alcohol. 53.3% of the women developed some maternal complication, being GHT=2.2%, PE=4.9% and GDM=6%; regarding fetal complications 8.8% developed CIR and a 25.1% had a premature birth. None of the social or lifestyle parameters were related to the later development of a maternal or a fetal complication. In relation to biochemical

parameters, an elevated level of triglycerides was associated with the development of both maternal and fetal complications and the elevation of uric acid with maternal complications. It was considered that the oxidative state scores were more robust than the individual parameters to predict gestational complications, finding that the Antiox-S and Global-S indexes were decreased in women who developed maternal and fetal complications, respectively. It was found that lower levels of cytokines IL-10 and IL-8 at the beginning of pregnancy were associated with the development of fetal complications. There was a relationship between higher levels of cortisol and the development of a fetal complication. Regarding the psychological aspects, it was evidenced that women with ART and with twin gestations, scored higher on scales of negative affectivity, problems of work and personal conciliation and anxiety. In addition, these women had high levels of cortisol and lower birth weight neonates. Positive correlations were also obtained between leukocyte levels and scores on various negative emotional scales.

**Conclusions.** 1) The increase in the age of maternity, as a result of social changes, has a negative influence on maternal and fetal health, even in populations with a high socioeconomic and cultural level and adequate nutrition. 2) To predict the development of a maternal-fetal pathology, the following plasma parameters can be considered: a) triglycerides and uric acid, b) oxidative state scores, c) leukocytes and IL-8. To confirm their validity as biomarkers, these parameters should be analyzed in a broader population. 3) The psychological pattern of the mother during pregnancy influences the biological and clinical-obstetric parameters, especially in the weight of the newborn, being particularly relevant in the context of ART.

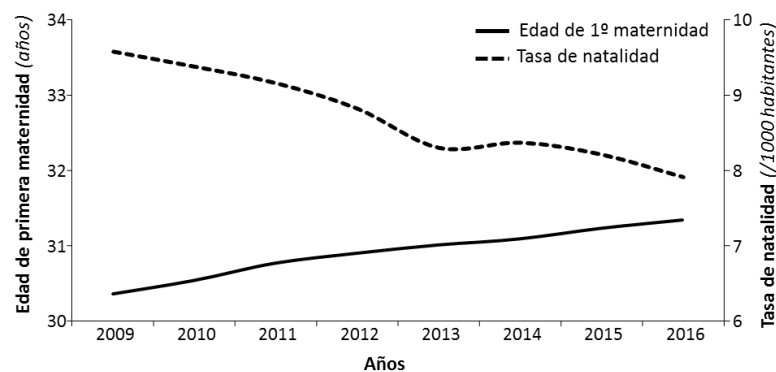
# *Introducción*

## 1. Aspectos sociales de la maternidad

La maternidad, más concretamente el periodo de gestación, contempla aspectos sociales, biológicos y psicológicos que se encuentran estrechamente interrelacionados. Los aspectos biológicos han permanecido inmutables desde hace más de 200000 años. Sin embargo, los aspectos socioculturales y psicológicos presentan una enorme variabilidad según el lugar, habiendo experimentado una gran transformación en las últimas décadas, particularmente en los países industrializados. El cambio en los patrones de maternidad es, por tanto, una realidad social que acontece en nuestros días (Bernis et al., 2016).

### 1.1. El retraso en la edad de maternidad

Uno de las características destacables de los países desarrollados -con alto nivel de ingresos- es el retraso en la edad de maternidad. La progresión demográfica en Europa en el siglo XX, descartando los dos períodos de grandes guerras, tiene una clara tendencia hacia una disminución de la natalidad y un aumento de la edad materna. Esta misma trayectoria empieza a vislumbrarse en siglo XXI en países emergentes del planeta (Ombelet et al., 2008). En España, según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE) se observa que, en entre los años 2009-2016 la edad media de primera maternidad ha ido aumentando; en el 2009 fue de 30.4 años y de 31.3 años en el 2016 (Figura 1). Los datos de la población española son similares a los de otros países de nuestro entorno socioeconómico (Bréart et al., 2003), así como de Estados Unidos (Ventura et al., 2009) y Australia (STATISTICS, 2007).



**Figura 1.** Edad de primera maternidad y tasa de natalidad en España, entre 2009 y 2016. Datos obtenidos a partir del Instituto Nacional de Estadística (INE).

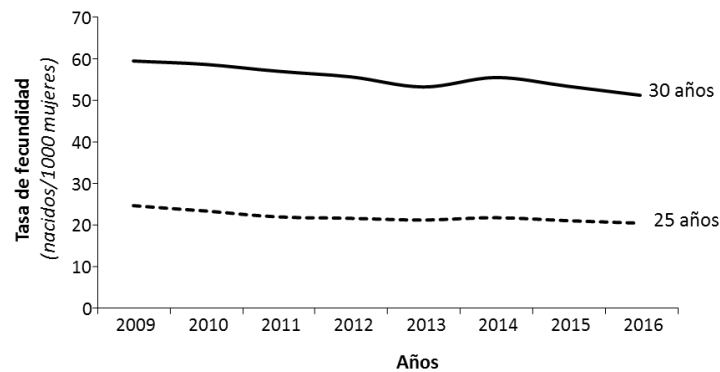


Entre los factores sociológicos que contribuyen al retraso en la edad de primera maternidad pueden incluirse la mayor participación de la mujer en el mercado laboral y la disponibilidad de métodos anticonceptivos eficaces. La larga preparación académica que ha necesitado nuestra generación para acceder a los puestos de trabajo, las dificultades económicas potenciadas por la crisis mundial para disponer de independencia social o la prelación de otros asuntos a la maternidad, han hecho que muchas mujeres se planteen el deseo de ser madres cuando por naturaleza ya no podrían serlo. La edad puede considerarse como uno de los principales factores implicados en la esterilidad y la infertilidad, pero los avances en reproducción asistida permiten el embarazo a edades avanzadas. Estos avances tecnológicos, que permiten la gestación “a cualquier edad”, nos enfrentan a nuevos problemas de índole ético y de salud acerca de cuál es el límite para que una mujer se quede embarazada (Luk et al., 2010). Una reflexión interesante en el contexto del cambio de mentalidad en la maternidad, es la que recoge Nicolás Mendoza en el libro “Estilos de vida y fertilidad” (Mendoza Ladrón de Guevara, Nicolás et al., 2012) en el que menciona que una mujer mayor, aun siendo posmenopáusica, puede no sentirse demasiado vieja para tener un hijo y puede ofrecerle una mejor educación que cuando tiene las carencias económicas o emocionales de otras edades más jóvenes.

**Consecuencias biológicas del retraso en la maternidad.** Los países industrializados enfrentan un importante problema de infertilidad (definida como incapacidad para generar gestaciones capaces de evolucionar hasta la viabilidad fetal) y de esterilidad (definida como la incapacidad para lograr gestación tras un año de relaciones sexuales con frecuencia normal y sin uso de métodos anticonceptivos).

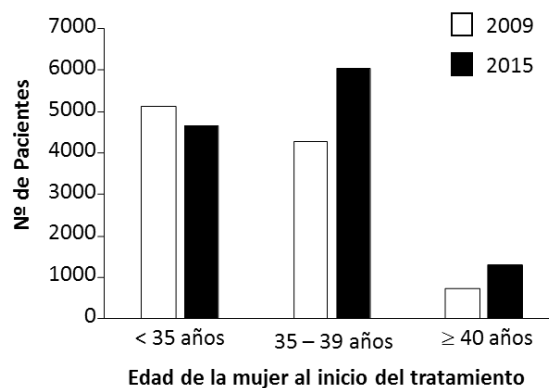
Aunque en el 25-35% de los casos de esterilidad el problema se debe al varón, en el 65-75% la causa es el aumento en la edad de maternidad, ya que la fertilidad de la mujer disminuye progresivamente conforme aumenta la edad (Peng y Huiguo, 2016). La fertilidad femenina óptima se estima entre los 20 y los 30 años de edad. Posteriormente comienza un proceso de disminución de la fertilidad debido al agotamiento de la dotación folicular, estimándose que hacia los 50 años el número de células germinales está muy reducido a causa de la muerte folicular por apoptosis. El proceso normal de envejecimiento reproductivo femenino varía considerablemente de

unas mujeres a otras, y unas perderán su fertilidad ya hacia los 35 años, mientras que otras continuarán siendo fértiles hasta la quinta década de la vida (Gielchinsky et al., 2008). En España, la tasa de fecundidad (nº de nacidos/1000 mujeres) en mujeres de 30 años es más alta que a los 25 años de edad. Además, estas tasas de fecundidad han ido disminuyendo progresivamente desde el 2009 hasta el 2016 (Figura 2).



**Figura 2.** Fecundidad en España en mujeres de 25 y 30 años de edad, entre los años 2009-2016. Datos obtenidos a partir del Instituto Nacional de Estadística (INE).

Una consecuencia importante relacionada con la pérdida de fertilidad es el progresivo aumento en el uso de técnicas de reproducción asistida (TRA). Entre las técnicas habituales están la estimulación ovárica, la fecundación *in vitro*/inyección intracitoplasmática de espermatozoides (FIV/ICSI) y la donación de ovocitos, siendo la FIV la más frecuentemente utilizada. Según datos de la Sociedad Española de Fertilidad, en el año 2009 se registraron 141 centros que trataron 26544 pacientes con FIV/ICSI. En 2015 la cifra de centros registrados ascendía a 286 y los pacientes en la misma categoría asistencial fueron 44477. Entre estas dos fechas, el mayor incremento en el uso de FIV corresponde a mujeres entre los 35 y los 39 años (Figura 3).



**Figura 3.** Mujeres tratadas con fecundación *in vitro* en 2009 y en 2015 en España, en función de la edad al inicio del tratamiento. Datos obtenidos a partir del informe de la Sociedad Española de Fertilidad.

En España los tratamientos de infertilidad están cubiertos por la Seguridad Social, siempre que se cumplan una serie de requisitos que la mayor parte de la población no reúnen, por lo que tiene que recurrir a la asistencia sanitaria privada. El precio en los tratamientos de TRA depende de la técnica empleada, así como del centro de reproducción y del país en el que se lleva a cabo. En España, según datos de la Sociedad Española de Fertilidad, el coste de un tratamiento de FIV es de 3000 a 5000 € (en Estados Unidos, donde toda la sanidad es privada, la FIV puede suponer \$ 10000-20000).

### *1.2. Gestación y estilos de vida*

El consumo de tabaco, de alcohol y/o de drogas son comportamientos propios de un estilo de vida poco saludable, que afectan de forma negativa a la fertilidad y a la gestación (Al-Gubory, 2014) incluso a la respuesta a las TRA. Es bien conocido que el consumo de tabaco durante el embarazo resulta perjudicial para la salud materno-fetal, por lo que se recomienda evitar el consumo de tabaco durante la gestación. Los efectos del tabaco parecen ser dosis-dependientes y están influidos por la presencia de otros tóxicos, el estado hormonal y el tiempo de consumo, entre otros factores. Diversos estudios, tanto epidemiológicos como en animales de experimentación, llegan a la conclusión de que el tabaco origina una reducción en el peso del recién nacido (Al-Gubory, 2014; Alonso Ojembarrena et al., 2005) y una mayor morbimortalidad perinatal (Escribano et al., 2012), que pueden ser consecuencia de la elevada toxicidad de algunos elementos del tabaco, principalmente el monóxido de carbono, así como de una alteración del flujo útero-placentario. También, se ha constatado que el tabaco aumenta los riesgos de rotura prematura de membranas, hemorragias anteparto, crecimiento intrauterino retardado (CIR), abortos e, incluso, está asociado con el aumento del riesgo de muerte súbita del lactante (Centers of Disease Control and Prevention). El embarazo está considerado como uno de los mejores momentos para abordar el abandono del hábito tabáquico debido a la gran motivación que tiene la mujer en este periodo: dejar de fumar por su propia salud y por la de su futuro hijo (Escribano et al., 2012).

En cuanto al consumo de alcohol durante la gestación, ha sido descrito que tiene efectos adversos cuando se consume de forma habitual ya que duplica el riesgo de

parto prematuro (Parazzini et al., 2003). El alcohol, además de ser un agente teratogénico, induciendo anomalías fetales, también interfiere –al igual que el tabaco– con el crecimiento fetal, incrementando el riesgo de bajo peso al nacer (Ko et al., 2014; Nykjaer et al., 2014). Además, el alcohol y el tabaco interfieren con el desarrollo fetal, predisponiendo al individuo al desarrollo de patologías en la edad adulta, lo que se conoce como "programación fetal". Entre otras alteraciones se ha evidenciado una disminución del rendimiento cognitivo y del coeficiente intelectual, problemas de atención, impulsividad (Carson et al., 2010) y una mayor prevalencia de hipertensión (Simonetti et al., 2011). Entre los mecanismos implicados en los efectos no deseables del alcohol, ha sido propuesto que el consumo de alcohol incrementa la apoptosis fetal afectando especialmente a la organización del sistema nervioso central. Estos efectos pueden ser consecuencia de un incremento de radicales libres, que dañan las membranas celulares por peroxidación lipídica, y de una disminución en las concentraciones de antioxidantes. Por otro lado, el alcohol influye en el retraso de crecimiento fetal ya que genera vasoconstricción y provoca una insuficiencia placentaria (Burd et al., 2007).

### *1.3. Aspectos nutricionales en la gestación*

La nutrición ejerce una enorme influencia sobre la gestación ya que la formación del nuevo ser requiere un aporte de nutrientes adecuados en cantidad y calidad. Es conocido que la desnutrición, tanto en el periodo periconcepcional como durante la gestación, puede ocasionar problemas de prematuridad y mortalidad fetal. Además, la obesidad también puede resultar perjudicial para la salud del futuro neonato. Es por ello que un buen estado nutricional inicial de la gestante, que incluya las necesidades en macro y micronutrientes, es de suma importancia para un óptimo desarrollo del embarazo.

Los requerimientos y recomendaciones nutricionales durante el embarazo han sido establecidos mediante estimaciones indirectas; es decir, se determinan las carencias que aparecen a lo largo del embarazo, que son evidenciadas mediante la analítica de rutina. Además, se asume que la capacidad de absorción y utilización de nutrientes se mantiene constante durante todo el periodo de gestación, lo que puede no ser cierto para algunos nutrientes. La recomendación general es un incremento de unas 150

kcal/día durante el primer trimestre y de 350 kcal/día para el resto del embarazo (Manau y Martínez, 2012). Parte de esta energía es almacenada en forma de depósitos de grasa, que constituyen un mecanismo de protección del feto frente a un posible estado de déficit al final de la gestación o durante la lactancia.

En cuanto a suplementos dietéticos, los más utilizados durante la gestación son el ácido fólico, el hierro y los complejos polivitamínicos. El ácido fólico y otros folatos son nutrientes esenciales por lo que deben ser incorporados en la dieta. La ingesta de ácido fólico es particularmente importante en la embarazada ya que las células son muy sensibles a su déficit, sobre todo en periodos como la embriogénesis. De hecho, hay una estrecha relación entre una deficiencia de ácido fólico y los defectos del tubo neural del feto, siendo el más característico el síndrome de espina bífida, habiéndose demostrado que el suplemento de ácido fólico durante la gestación reduce la incidencia de defectos del tubo neural del feto en un 72% (Lardoyt Ferrer et al., 2005). Estudios epidemiológicos muestran una asociación entre estos defectos y dietas pobres en verduras y fruta fresca, alimentos ricos en ácido fólico (Manau y Martínez, 2012). Además, un déficit de ácido fólico se ha asociado con abortos espontáneos (Nelen et al., 2000), desprendimiento prematuro de la placenta y preeclampsia (Wang et al., 2000). Es por ello que el Ministerio de Sanidad recomienda a toda mujer que esté planeando un embarazo, además de una ingesta adecuada de alimentos que aporten ácido fólico (frutas y vegetales de hoja verde, entre otros), tenga una suplementación con 0.4 mg/día de ácido fólico. Esta suplementación debe mantenerse como mínimo hasta el final del primer trimestre y, en caso de gemelaridad, durante toda la gestación.

El consumo de polivitamínicos durante la gestación está ampliamente extendido. Sin embargo, algunos autores han cuestionado la efectividad de estos suplementos múltiples debido a las posibles interacciones entre los mismos. Por ejemplo, la vitamina C es un importante factor que favorece la absorción del hierro de la dieta, pero, los suplementos con vitamina C durante periodos prolongados pueden deteriorar la absorción del cobre y contrarrestar así el efecto positivo sobre la absorción del hierro. Además, los suplementos pueden llevar a niveles excesivos que pueden resultar perjudiciales. Así, dosis altas de vitamina A durante el embarazo tienen efecto teratogénico. Según una revisión de Cochrane (Haider y Bhutta, 2006) no

hay evidencia de que la suplementación con micronutrientes múltiples durante la gestación suponga mayores beneficios que la suplementación exclusiva con hierro y ácido fólico. En la práctica clínica se suele recomendar la suplementación con polivitamínicos ya que, se considera que el beneficio es superior a los posibles inconvenientes.

#### *1.4. El sueño y su relación con la gestación*

La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda que los adultos entre 26 y 64 años duerman entre 7 y 9 horas al día y, en el caso de las mujeres embarazadas, más de 8 horas. Los patrones de sueño cambian durante el embarazo; en el primer trimestre suele aumentar la necesidad de dormir debido al incremento en los niveles de testosterona; durante el segundo trimestre, el sueño puede verse interrumpido por la necesidad de orinar o por molestias tanto circulatorias como digestivas; en el tercer trimestre, las dificultades para encontrar una postura adecuada para descansar, sumado a la ansiedad debida a la proximidad del momento del parto, dificultan la conciliación del sueño.

Es conocido que la melatonina interviene, entre otros, en la regulación del ciclo vigilia/sueño (Santiago et al., 2001). La melatonina es una hormona que se secreta en ausencia de luz, por lo que alcanza su concentración máxima durante la noche. Durante el periodo gestacional, los niveles plasmáticos de melatonina son superiores a los de una mujer no embarazada. Además, estos niveles van incrementándose a partir de la semana 24 de gestación alcanzando su máximo al final de la misma, contribuyendo en el parto, junto con la oxitocina. Los niveles de melatonina maternos revierten a sus niveles normales durante la lactancia (Tamura et al., 2008). Por otro lado, la calidad del sueño también se ve influenciada por los patrones conductuales, como la ansiedad, que se encuentran alterados en situaciones de estrés psicológico. Es por ello, que en situaciones de ansiedad se tenga una peor percepción del descanso. Además, el estrés psicológico eleva los niveles de cortisol (Leproult et al., 1997), hormona que tiene una influencia negativa sobre el crecimiento fetal (Littleton et al., 2010).

## 2. Aspectos biológicos de la gestación

### 2.1. Complicaciones maternas y fetales durante la gestación

En las últimas décadas la estandarización de los cuidados durante el embarazo, los avances en las técnicas obstétricas y anestésicas y la mejora de la neonatología han permitido reducir de manera muy significativa la morbilidad materno-infantil. Sin embargo, los cambios sociales y demográficos acontecidos (la mayor edad de las gestantes, el incremento en la prevalencia de enfermedades crónicas previas como obesidad, diabetes o hipertensión arterial), han contribuido a incrementar las enfermedades propias del embarazo. Cabe mencionar que la mujer embarazada puede tener las mismas enfermedades que la mujer no embarazada y algunas más que son propias de ese estado. Entre las complicaciones gestacionales más frecuentes encontramos:

- **Colestasis intra-hepática** [K71.0 y K83.1]. Tiene una incidencia de  $\approx 0.05\%$  de los embarazos. Se caracteriza por la existencia de prurito durante el tercer trimestre de la gestación, seguido de ictericia con incremento de bilirrubina. Las transaminasas pueden ser normales o aumentar ligeramente. No se asocia a mortalidad materna y en un 0.4-1.4% se asocia a mortalidad fetal.
- **Dermopatías.** Durante el embarazo se producen una serie de modificaciones en el sistema endocrino, inmunológico y metabólico que son responsables de los cambios fisiológicos de la piel durante la gestación. Además, las dermatosis habituales pueden verse alteradas por el embarazo. Entre las dermatosis específicas del embarazo, la más frecuente es la erupción polimórfica del embarazo [O99.7], que aparece en el 0.7%. Se inicia alrededor del tercer trimestre como unas pápulas y placas pruriginosas que se extienden a los muslos y glúteos. No tiene repercusión en el feto.
- **Anemia gestacional** [O99.0]. El embarazo es una situación que predispone a la aparición de anemia, por la discordancia entre el aumento de la masa eritrocitaria y el incremento del volumen plasmático. La anemia ferropénica es la más frecuente durante el embarazo ya que los requerimientos de hierro se

incrementan a partir del segundo trimestre, por lo que el 25% de las gestantes tienen ferropenia, y de éstas, el 33% tendrán anemia. La anemia cursa con palidez cutáneo-mucosa, astenia, disnea, taquicardia o sudoración. Se asocia con embarazos pretérmino, bajo peso del recién nacido y aumento de la mortalidad perinatal.

- **Hiperémesis gravídica** [O21.0 y O21.1]. Aparece en el 0.3% de los embarazos. Se caracteriza por la aparición, en el primer trimestre de la gestación, de vómitos incoercibles que producen deshidratación y desnutrición aguda. Es más frecuente en gestantes jóvenes, primíparas, obesas y no fumadoras y puede repetirse en sucesivos embarazos. Se ha asociado con gestaciones múltiples, hipertiroidismo o alteraciones psiquiátricas. No se asocia a mortalidad ni materna ni fetal.
- **Hipertensión gestacional** [HTG; O13 y O14]. Es la complicación médica más frecuente durante el embarazo (10% de todas las gestaciones) y constituye la principal causa de muerte materna y de morbimortalidad perinatal. Durante el embarazo se producen fluctuaciones fisiológicas de la presión arterial, que va disminuyendo a lo largo de la gestación. La HTG se define como: presión arterial sistólica  $\geq 140$  mm de Hg y/o presión arterial diastólica  $\geq 90$  mm de Hg. La HTG es aquella que aparece después de la semana 20 de gestación y que habitualmente no se acompaña de proteinuria ni de otras manifestaciones orgánicas. El 15-20% de los casos de gestantes con HTG puede complicarse con preeclamsia.
- **Preeclamsia** [PE; O11, O13 y O14]. Es una complicación sistémica que aparece después de la semana 20 de gestación. Se origina a consecuencia de alteraciones en la vasculatura útero-placentaria, lo que desencadena hipertensión y alteración en órganos como riñón, hígado, cerebro y sistema de coagulación. El cuadro suele cursar con la aparición de proteinuria, hiperuricemia y edemas generalizados. La prevalencia de PE oscila entre los 2-8% de los embarazos y la posibilidad de recurrencia en un nuevo embarazo es del 10%.
- **Diabetes gestacional** [DMG; O24]. Se define como una intolerancia a la glucosa que comienza durante el embarazo. Su prevalencia oscila entre 1-10% de los



embarazos. Entre los factores de riesgo para el desarrollo de DMG están una edad superior a los 25 años, obesidad, antecedentes familiares de diabetes o DMG previa. Para el diagnóstico de DMG, en primer lugar, se utiliza el test de O'Sullivan. Este test, que determina la glucosa plasmática a los 50 minutos de administrar 50 g de glucosa, se lleva a cabo en el segundo trimestre en todas las gestantes y en el primer trimestre en las mujeres de alto riesgo. Tras el test, a las mujeres con glucemia  $\geq 140$  mg/dl se les realiza la prueba de sobrecarga oral de 100 g de glucosa para determinar el diagnóstico final de DMG. Las complicaciones de la DMG son PE, macrosomía fetal, bajo peso al nacer o mortalidad perinatal.

En este trabajo, se han considerado como complicaciones maternas severas la HTG, la PE, y la DMG ya que, no solo presentan una alta frecuencia, sino que también conllevan repercusiones importantes tanto para la salud materna como fetal.

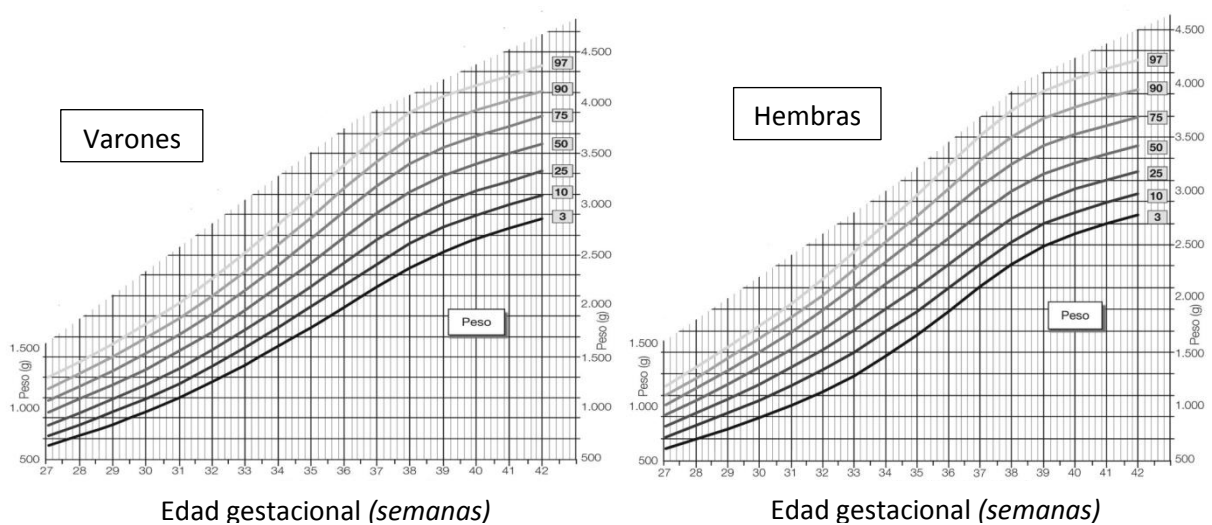
En relación al feto, una de las variables clínicas esenciales para evaluar la supervivencia de los recién nacidos es su peso al nacer. Un bajo peso en el momento del nacimiento se ha asociado con el desarrollo de enfermedades en la edad adulta tales como obesidad, hipertensión arterial o diabetes mellitus tipo 2 (Rebollar et al., 2010), todas ellas consideradas como factores de riesgo de enfermedad cardiovascular.

Se considera normopeso los recién nacidos cuyo peso oscila entre 2500-4200 gr (2000-4000 gr en el caso de gestaciones gemelares). La prevalencia de bajo peso al nacer oscila entre el 3-7% de los nacimientos. El peso del recién nacido tiene correlación directa con la edad gestacional por lo que, la incidencia de bajo peso aumenta en los partos prematuros. Algunos factores genéticos predisponen a desarrollar un bajo peso, pero hay otros factores, como el consumo de tabaco y alcohol durante la gestación (Prendes Labrada et al., 2001) o complicaciones como la HTG o la DMG, que también hacen que aumente la prevalencia (Peraza Roque et al., 2001).

Más allá de la participación fisiopatológica, el componente psicológico materno podría también explicar en parte un bajo peso al nacer. Datos de la OMS indican que las mujeres víctimas de violencia durante la gestación, que es una situación de estrés propiamente, presentan un riesgo tres veces mayor de tener hijos con bajo peso al nacer (Núñez-Rivas et al., 2003). Estos datos ponen de manifiesto que el componente psicológico influye en los parámetros biológicos.

Las características del periodo gestacional, no sólo afectan a la salud materna, sino también tiene una clara incidencia sobre la salud del feto, pudiendo inducir complicaciones fetales. Entre las más frecuentes pueden citarse:

- **Crecimiento intrauterino retardado** [CIR; P05 y P07]. Se refiere a un crecimiento deficiente del neonato mientras está en el útero. Su prevalencia oscila entre el 3-10% de los recién nacidos. Su diagnóstico se realiza por mediciones ecográficas, que permiten determinar el peso intrauterino. Además de estas mediciones, la ecografía permite estudiar el flujo placentario mediante la técnica Doppler. A través del Doppler se valora la hemodinámica de la placenta, que es un reflejo del aporte de oxígeno y nutrientes al feto. Los criterios diagnósticos de CIR son: peso intrauterino inferior al percentil 3 o inferior al percentil 10 si hay alteraciones hemodinámicas (Figura 4). Además, el 90% de los casos CIR presentan un bajo peso al nacer. Algunas de las causas que pueden provocar CIR son la exposición a fármacos o drogas, el consumo de tabaco y alcohol o factores socioeconómicos adversos (Haram et al., 2006). Por otro lado, una placentación inadecuada o problemas maternos como desnutrición, anemia, HTG o DMG, también se han asociado a una mayor prevalencia de CIR. El CIR también se ha asociado con problemas en el periodo neonatal como dificultad respiratoria, hipoglicemia neonatal, enterocolitis necrotizante o muerte (Bernstein et al., 2000).



**Figura 4.** Representación gráfica del peso al nacer según su edad gestacional y sexo. Modificado de Lezcano et al., 2008.

- **Prematuridad** [O60.1 y P07.3]. La mayoría de las gestaciones duran más de 37 semanas, lo que se conoce como gestaciones a término. La prematuridad es definida como las gestaciones que duran menos de 37 semanas. 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. Los factores que predisponen a desarrollar un parto pretérmino incluyen el consumo de tabaco o alcohol, un bajo nivel socioeconómico/educativo, 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 (HTG o DMG) 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 y Wilcox, 2010).

## 2.2. Embarazos de alto riesgo

Un embarazo de alto riesgo es aquel que tiene más posibilidades de desarrollar complicaciones durante la gestación y el puerperio. Se estima que un 10% de los embarazos son de alto riesgo. Algunos de los factores biológicos maternos que determinan que un embarazo sea de alto riesgo son:

- Edad. Embarazos en edades inferiores a los 18 años tienen más riesgo de desarrollar PE. Las gestaciones en madres con edades superiores a los 35 años se asocian con HTG, DMG, complicaciones durante el parto y riesgo de anomalías cromosómicas fetales.
- Peso y talla. Mujeres con pesos inferiores a 45 kg al inicio de la gestación tienen más riesgo de neonatos de bajo peso. Madres obesas tienen mayor riesgo de DMG. Gestantes con estatura inferior a 1.60 m tienen más probabilidad de tener parto prematuro.

- Antecedentes clínicos de hipertensión arterial, diabetes mellitus, enfermedades autoinmunes o incompatibilidades madre-feto del Rh.
- Complicaciones obstétricas como problemas de placentación, placenta previa o desprendimiento placentario.
- Complicaciones fetales como CIR o amenazas de parto prematuro.

Además de estos factores las gestaciones múltiples, aquellas en las que se desarrolla más de un feto (ya sean monocigóticos o dicigóticos), también se consideran embarazos de alto riesgo. Es importante destacar que, las gestaciones gemelares tienen una incidencia del 2% en los embarazos espontáneos, mientras que representan el 35% de los embarazos mediados por TRA (Cabañas et al., 2009). Las gestaciones múltiples están asociadas a un incremento en la aparición de complicaciones como hiperémesis gravídica, anemia, lumbociática, mareo por compresión de la cava y la aorta, síndrome varicoso en miembros inferiores, HTG, DMG, desprendimiento de placenta, cesáreas, hemorragia postparto, abortos, CIR, partos prematuros o recién nacidos de bajo peso. Por otro lado, el impacto psicológico que supone la llegada de dos o tres recién nacidos a casa, aumenta el riesgo de depresión postparto por lo que es necesario que la madre tenga una ayuda social y un apoyo psicológico.

### *2.3. Balance oxidativo durante la gestación*

#### *2.3.1. Balance oxidativo*

En condiciones normales, como consecuencia del metabolismo aerobio, se generan especies químicas altamente reactivas. Las más abundantes son las especies reactivas de oxígeno que incluyen, tanto los radicales libres de oxígeno (ROS; por sus siglas en inglés; Reactive Oxygen Species) como las especies no radicálicas (Halliwell y Gutteridge, 2015). Los ROS son moléculas que contienen uno o más electrones desapareados y que, a bajas concentraciones participan en importantes funciones fisiológicas como son la señalización celular y la defensa inmunitaria. Sin embargo, cuando se encuentran en exceso -al ser sustancias pro-oxidantes- pueden producir daño oxidativo a macromoléculas (lípidos, proteínas y ADN) alterando la función celular y participando en el desarrollo de patologías (Valko et al., 2007).

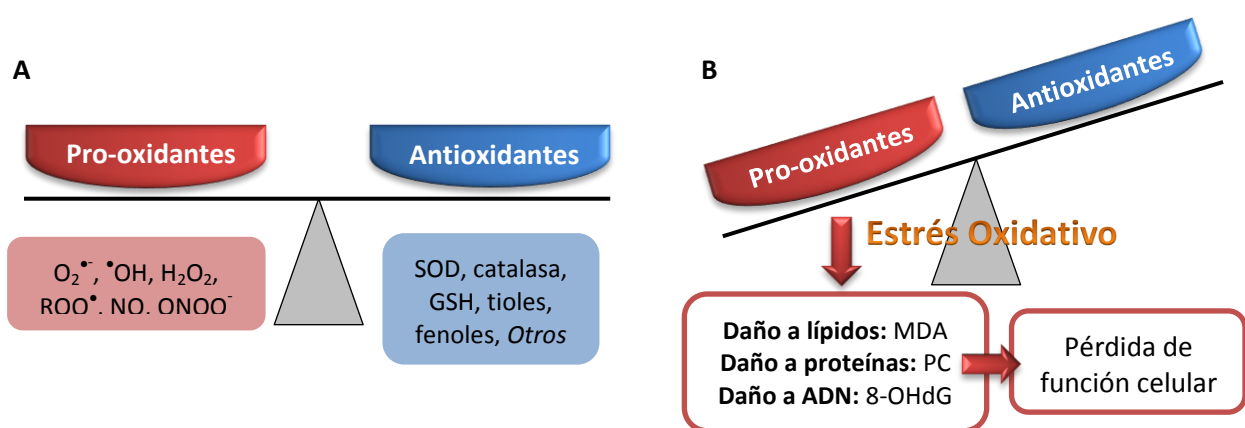
Entre los ROS más relevantes están el radical anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), que es un ROS primario; el radical hidroxilo ( $^{\bullet}OH$ ), un ROS de corta vida media pero altamente tóxico; el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), un oxidante débil en condiciones fisiológicas que puede actuar como oxidante o como reductor; el radical peroxilo ( $ROO^{\bullet}$ ), que participa en la peroxidación lipídica *in vivo*. Además, son biológicamente relevantes las especies reactivas derivadas del nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés; Reactive Nitrogen Species) como el óxido nítrico (NO), que participa en numerosas reacciones biológicas y el radical peroxinitrito ( $ONOO^{\bullet}$ ), producto de la reacción entre  $O_2^{\bullet-}$  y el NO, que es una especie reactiva altamente tóxica, participando en la peroxidación lipídica y el daño oxidativo a proteínas. Los niveles de ROS y RNS son difíciles de medir en sistemas biológicos, por su corta vida media.

Debido a la alta reactividad de los ROS/RNS, los organismos aerobios han desarrollado sistemas de eliminación de estas especies reactivas, que evitan el daño oxidativo producido por un exceso en estos radicales. Estas sustancias son conocidas como antioxidantes y pueden definirse como moléculas que, a bajas concentraciones respecto al sustrato oxidable, retrasan o previenen su oxidación (Halliwell y Gutteridge, 2015).

Los antioxidantes se pueden clasificar atendiendo a diversos criterios. Atendiendo al origen de la molécula, pueden ser endógenos -que incluyen tanto sistemas enzimáticos como no enzimáticos- o exógenos, procedentes de la dieta -como vitaminas, polifenoles o carotenoides- (Balasundram et al., 2006). Los sistemas antioxidantes enzimáticos se encuentran mayoritariamente dentro de la célula, pero pueden salir al espacio extracelular y encontrarse en fluidos corporales donde pueden ser cuantificados. Entre los sistemas antioxidantes enzimáticos más importantes están las superóxido dismutasas (SODs), la catalasa y la glutatión peroxidasa. Los sistemas antioxidantes no enzimáticos (antioxidantes de bajo peso molecular) constituyen una primera línea de defensa frente a ROS, actuando como secuestradores de los radicales libres. Entre ellos podemos encontrar el glutatión reducido (GSH), moléculas con grupos tiol y el ácido úrico (aunque a elevadas concentraciones puede actuar como pro-oxidante). También hay que considerar como antioxidantes otras moléculas como la hormona melatonina, que también tiene capacidad de secuestrar radicales libres, así

como de estimular a los sistemas antioxidantes anteriormente descritos (Reiter et al., 2000).

En un sistema fisiológico, la producción y eliminación de ROS/RNS está equilibrada de manera que no se produce daño oxidativo (Figura 5A). Sin embargo, si el balance entre los oxidantes y los sistemas antioxidantes se desequilibra a favor de los primeros, se produce el fenómeno conocido como estrés oxidativo, que oxida macromoléculas, altera la función celular y puede estar en el origen de distintas patologías (Figura 5B; (Camps y García-Heredia, 2014)). Es por esto por lo que evaluar este daño oxidativo es de gran interés en biomedicina. Las primeras macromoléculas que sufren procesos oxidativos son los lípidos, en especial los ácidos grasos poliinsaturados que forman las membranas celulares. Este proceso -conocido como peroxidación lipídica- puede ser evaluado mediante biomarcadores como los isoprostanos o el malondialdehído (MDA). Las proteínas también son susceptibles de oxidación en sus residuos carbonilos y de nitración en sus residuos de tirosina. Por tanto, los grupos carbonilos y las proteínas nitrosiladas pueden ser utilizados como biomarcadores de daño oxidativo a proteínas. El ADN, aunque está más protegido de los procesos oxidativos (Ortuno-Sahagun et al., 2014), también es susceptible de oxidación, particularmente en estados avanzados de procesos fisiopatológicos. El biomarcador más utilizado como medida del daño a ADN es la 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG).



**Figura 5.** Balance oxidativo (A) y estrés oxidativo (B) en los sistemas biológicos.  $O_2^{\bullet-}$ , radical anión superóxido;  $\bullet OH$ , radical hidroxilo;  $H_2O_2$ , peróxido de hidrógeno,  $ROO^{\bullet}$ , radical peroxilo; NO, óxido nítrico;  $ONOO^-$ , radical peroxinitrito; SOD, Superóxido dismutasa; MDA, malondialdehído; PC, Proteínas carboniladas; 8-OHdG, 8-hidroxideoxiguanosina.

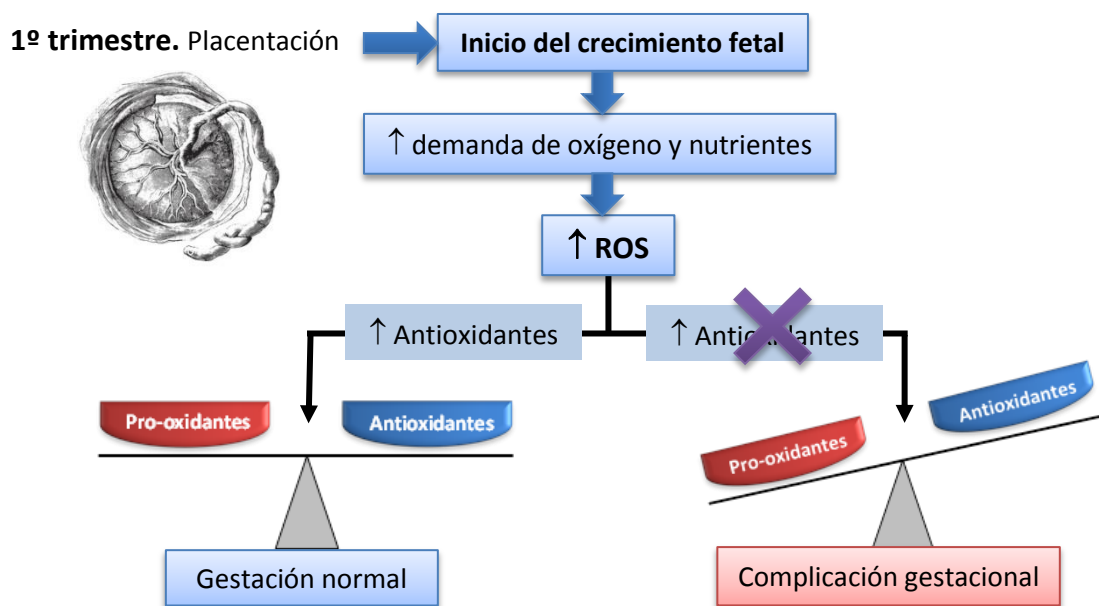
En la mayoría de los estudios sobre estrés oxidativo se miden los antioxidantes y los biomarcadores de daño oxidativo de forma individual. Sin embargo, debido a la gran cantidad de antioxidantes y sus reacciones en cadena se ha sugerido que, para evaluar el estado oxidativo global es más apropiado medir el máximo número de antioxidantes y de biomarcadores de daño oxidativo y, a partir de ellos, obtener un índice global o *score* que reflejaría de forma más fiable el estado oxidativo del individuo en un determinado momento (Veglia et al., 2010). La metodología para el cálculo de estos índices ha sido validada anteriormente en diversos estudios en nuestro grupo de investigación (Condezo-Hoyos et al., 2013; Ruiz-Hurtado et al., 2014; Rodríguez-Rodríguez et al., 2015).

### 2.3.2. Estrés oxidativo y patología obstétrica

Las especies reactivas juegan un papel importante en la gestación ya que participan en procesos como la implantación o la placentación (Jauniaux et al., 2006). Sin embargo, cuando están en exceso pueden producir daño oxidativo, el cual se ha asociado con diversas patologías materno-fetales. Una elevación importante de ROS se produce entre la semana 10-12 de gestación, cuando la presión parcial de oxígeno se eleva de forma rápida en la placenta, al establecerse el flujo sanguíneo materno-fetal. En condiciones fisiológicas, este aumento se equilibra gracias a un incremento de los principales sistemas antioxidantes (Jauniaux et al., 2000; Wu et al., 2015a). Diversos estudios indican que las mujeres embarazadas, aún sin complicaciones obstétricas, presentan mayores niveles de ROS que las mujeres no embarazadas (Djordjevic et al., 2004) si bien, la importancia radica en el equilibrio entre los ROS y los sistemas antioxidantes, tanto endógenos como los procedentes de la dieta. Diversas patologías de la gestación se asocian a estrés oxidativo. Así, En algunas patologías gestacionales se han encontrado alterados diversos marcadores de daño oxidativo, incluyendo MDA (Orhan et al., 2003; Bernardi et al., 2008) o grupos carbonilos (Bernardi et al., 2008; Zusterzeel et al., 2001). Se ha sugerido que el daño oxidativo a lípidos y proteínas, en mujeres que desarrollan PE, es consecuencia de una deficiencia de antioxidantes endógenos (Zusterzeel et al., 2001; Llurba et al., 2004). Así mismo, se ha descrito que una dieta rica en frutas y verduras, reduce el riesgo de algunas patologías obstétricas (Schoenaker et al., 2015). Estos estudios se han realizado al final de la gestación,

cuando la patología ya ha sido diagnosticada, por lo que la presencia de daño oxidativo puede ser consecuencia de la propia enfermedad.

El estrés oxidativo materno no solo tiene un impacto en la salud de la madre, sino que puede comprometer también el desarrollo del feto debido a una reducción en la perfusión placentaria y, por tanto, en la nutrición fetal (Karowicz-Bilinska et al., 2007; Hracsko et al., 2008). Se ha propuesto que el daño oxidativo en la placenta es responsable de restricción del crecimiento fetal, ya que en embarazos CIR, se encuentran niveles elevados de daño oxidativo a ADN (Fujimaki et al., 2011). En la figura 6 se representa cómo el aumento de ROS en el primer trimestre de la gestación, si se contrarresta con un aumento proporcional en antioxidantes conduce a una gestación normal; sin embargo, cuando no aparece este incremento en antioxidantes conlleva a la aparición de complicaciones obstétricas.



**Figura 6.** Consecuencias sobre la salud gestacional de los posibles cambios en los sistemas antioxidantes al inicio de la gestación.



#### 2.4. Hormonas

Durante el embarazo se ven afectados los niveles de algunas hormonas que son necesarias para un correcto estado gestacional. Muchas de ellas son sintetizadas por la placenta como la gonadotropina coriónica humana (hCG; solo se sintetiza durante el embarazo), el lactógeno de la placenta humana (hPL; ayuda en la nutrición fetal), los estrógenos (sintetizados tanto por la placenta como por los ovarios) y la progesterona (sintetizada tanto por la placenta como por los ovarios, encargada del engrosamiento uterino como anticipación a la implantación). Además, hay otras hormonas no circunscritas estrictamente al proceso gestacional, que tienen gran relevancia por sus funciones durante el embarazo y su posible implicación en procesos fisiopatológicos. Entre ellas están la melatonina y el cortisol.

La melatonina se produce principalmente en la glándula pineal, aunque también puede ser sintetizada en otros tejidos como las glándulas suprarrenales, las células inmunes, el endometrio o la placenta. La melatonina participa en una gran variedad de procesos celulares, neuroendocrinos y neurofisiológicos, como controlar el ciclo diario del sueño, y su déficit está asociado con insomnio y depresión (A Quera Salva et al., 2011). Su síntesis disminuye a partir de los 30 años de edad. Una de las características más sobresalientes respecto a la biosíntesis pineal de melatonina es su variabilidad a lo largo del ciclo de luz/oscuridad. La biosíntesis de melatonina se realiza a partir de serotonina con la participación de la enzima N-acetil transferasa, que tiene una actividad mayor en ausencia de luz, motivo por el cual los mayores niveles de melatonina en plasma aparecen durante la noche. Durante el embarazo, los niveles plasmáticos de melatonina van incrementándose ligeramente hasta la semana 24 de gestación, momento en el cual sufren una gran elevación hasta momentos previos al parto, cuando los niveles de melatonina vuelven a sus niveles basales (Tamura et al., 2008). Revisiones realizadas en Cochrane sobre embarazo y melatonina (Wilkinson et al., 2013) encontraron, en animales, que la administración de melatonina a la madre proporciona una función neuroprotectora en el feto. Un ensayo controlado aleatorio en curso, en embarazadas con riesgo de parto prematuro, examina la dosis de melatonina necesaria para reducir el daño cerebral de los fetos (Hobson et al., 2013).

El cortisol es otra hormona esencial en los sistemas biológicos, que tiene un amplio efecto sobre el metabolismo de los hidratos de carbono, grasas y proteínas, la homeostasis del agua y los electrolitos, la supresión del sistema inmunitario o el incremento de la glucemia a través de la gluconeogénesis.

Uno de los efectos del cortisol en relación con el desarrollo fetal es que disminuye la formación ósea, ocasionando problemas en el crecimiento. En una gestación saludable, los niveles plasmáticos de cortisol materno van elevándose desde el inicio de la gestación hasta aproximadamente la semana 30 de gestación manteniéndose estables hasta el parto. El feto no sintetiza cortisol hasta el tercer trimestre (Mastorakos y Ilias, 2003), y el acceso de cortisol materno hacia el feto está limitado por la acción de la enzima placentaria 11- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (11 $\beta$ -HSD2) ya que, un acceso elevado de cortisol al feto, al inicio de la gestación, podría afectar su desarrollo cerebral (Talge et al., 2007).

El cortisol es una hormona que responde a ritmos circadianos de producción y secreción, de manera similar a la melatonina, con la diferencia de que los niveles diurnos de cortisol son más elevados a los encontrados durante la noche. Aunque hay variaciones individuales, se han encontrado pautas diferentes en los niveles plasmáticos de cortisol en relación con situaciones fisiológicas como hipoglucemia, fiebre, miedo, dolor o esfuerzo físico (Robson et al., 1999). Además, es bien conocido que el estrés psicológico eleva los niveles de cortisol (Leproult et al., 1997) habiéndose asociado con psicopatologías como la depresión clínica (Wingenfeld et al., 2009). Otro efecto que se ha postulado en relación al cortisol y la gestación es que el estrés materno, asociado a mayores niveles de cortisol, podría provocar vasoconstricción placentaria reduciendo el aporte sanguíneo fetal. Así, las madres con elevadas puntuaciones en la escala de ansiedad presentaron, en el tercer trimestre de embarazo, un flujo de sangre uterino menor que las embarazadas con menor ansiedad (Littleton et al., 2010).

### 2.5. Citoquinas

Las citoquinas son proteínas producidas fundamentalmente por los linfocitos y los macrófagos activados, aunque también pueden ser producidas por otros leucocitos y por células endoteliales, epiteliales o adipocitos, entre otras. Las citoquinas participan en la regulación de numerosas respuestas celulares. Entre sus funciones están la proliferación y diferenciación celular o la quimiotaxis aunque, su acción fundamental consiste en regular los mecanismos de inflamación, siendo unas proinflamatorias y otras antiinflamatorias (Tabla 1).

**Tabla 1.** Citoquinas pro y antiinflamatorias cuantificadas en este trabajo.

Citoquinas	Síntesis	Acciones principales	
<b>Proinflamatorias</b>	IL-1 $\beta$	Células mononucleares y macrófagos	Activación de células T-helper, Activación de la apoptosis
	IL-8	Monocitos, macrófagos, célula endoteliales, etc.	Factor quimiotáctico y activador de neutrófilos, angiogénesis, vasodilatación
	MCP-1	Monocitos, linfocitos, células endoteliales, etc.	Reclutamiento de monocitos y células T de memoria en lesiones tisulares
	TNF- $\alpha$	Macrófagos, células endoteliales, adipocitos, etc.	Activación de la apoptosis, promotor de migración celular
<b>Antiinflamatorias</b>	IL-10	Monocitos y linfocitos T	Proliferación y supervivencia celular, producción de anticuerpos

IL, Interleuquina; MCP, Proteína quimiotáctica de monocitos; TNF, Factor de Necrosis Tumoral.

En un embarazo normal, la placenta secreta a la circulación materna distintos factores inmunitarios que pueden contribuir a la tolerancia inmunitaria hacia el feto y que facilitan la placentación (Taylor et al., 2016). La hipótesis que se plantea en relación a la inmunidad, la placentación y las complicaciones obstétricas es que una elevada inflamación en la decidua placentaria podría limitar la invasión del trofoblásto lo que, en última estancia, conllevaría a una mala placentación, al aborto espontáneo, la PE o el CIR (Khong et al., 1986).

Estudios en el tercer trimestre de gestación han demostrado que mujeres con PE presentan mayores niveles plasmáticos de marcadores proinflamatorios -como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) y las interleuquinas (IL) 8 y 1 $\beta$ - que en embarazos sin PE (Szarka et al., 2010). Sin embargo, los estudios realizados en el segundo trimestre son contradictorios: mientras que ciertos autores encuentran

niveles reducidos de IL10 o TNF- $\alpha$  en las mujeres que desarrollan PE (Kumar et al., 2013), otros estudios reportan que no hay diferencias significativas en los marcadores de citoquinas circulantes entre embarazos con o sin PE (Mundim et al., 2016). Otros estudios han constatado que la IL-1 $\beta$  elevada en el primer trimestre de gestación podría ser un predictor de PE (Siljee et al., 2013). En relación a los posibles mecanismos inmunológicos implicados en la génesis del CIR, algunos estudios indican una elevación en los niveles plasmáticos de citoquinas proinflamatorias, sobre todo de TNF- $\alpha$ , en gestantes con embarazos CIR (Spong et al., 1997), habiendo sugerido que la insuficiencia placentaria tiene un papel clave (Bartha et al., 2003).

La búsqueda de biomarcadores predictivos de una patología obstétrica es de gran interés en clínica, particularmente en la actualidad, por el incremento progresivo de estas complicaciones gestacionales. Se han descrito algunos biomarcadores que han podido ser evaluados en el primer y segundo trimestre de la gestación. Sin embargo, estos biomarcadores considerados individualmente no tienen un alto valor predictivo (Wu et al., 2015b), habiéndose sugerido que la medida de un conjunto de biomarcadores plasmáticos junto con parámetros clínicos, como las ecografías, podría ser una aproximación más fiable para el diagnóstico precoz (Zhao et al., 2013). Hay que considerar, además, que la determinación de estos biomarcadores debería ser económicamente asumible por el sistema sanitario, por lo que es preciso buscar moléculas accesibles y fáciles de medir.

### 3. Aspectos psicológicos de la maternidad

Es conocida la importancia de los cambios emocionales que cursan las mujeres durante la etapa gestacional, que en ocasiones llegan a considerarse como trastornos de entidad clínica, sobre todo de tipo ansioso y/o depresivo. Algunos estudios epidemiológicos mencionan prevalencias del 40% para este tipo de alteraciones emocionales (Moreno et al., 2007). Para la mayoría de las mujeres, el embarazo suele constituir un periodo estresante, aunque esta nueva situación sea bien recibida por la gestante, su pareja y el entorno familiar. Los cambios endocrinos o la propia reorganización psicológica que requieren el convertirse en madre se constituyen en factores que propician una mayor vulnerabilidad para la aparición de trastornos psicopatológicos (Langley-Evans, 2001).

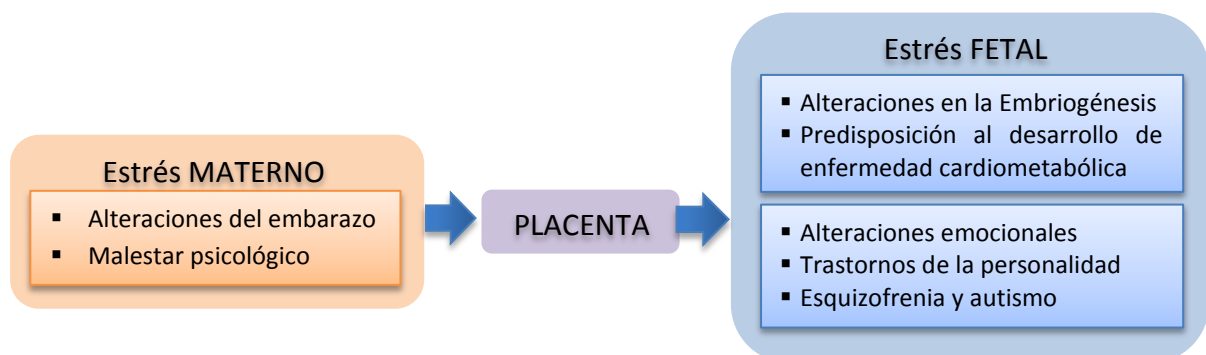
Durante el embarazo, la mujer se prepara mentalmente para cambios permanentes en su vida, de ahí que sean normales tanto los sentimientos de ambivalencia, como las preocupaciones por la propia salud y la del futuro hijo (Valdés y García-Esteve, 2017). Por otro lado, son habituales los temores al parto, entre el 6-13% experimentan miedo intenso (Valdés y García-Esteve, 2017). La mitad de las embarazadas comunica más síntomas de ansiedad y depresión que antes del embarazo y todas ellas aumentan la secreción de hormonas como el cortisol (Pinto-Dussán et al., 2010). Además del estrés psicológico propio de la gestación, un aumento del estrés por otras causas se sobreañadirá a la actividad promovida por el embarazo.

Los cambios en el estilo de vida, hábitos alimenticios y los patrones de sueño, junto con aspectos personales como su estatus laboral o su papel con respecto a la sociedad, pueden también ser fuentes de distrés (Dole et al., 2003). Existe evidencia de que una hiperactividad simpática, propia de la primera fase del estrés, puede ser el origen de partos prematuros o HTG (Mulder et al., 2002).

**Repercusiones fetales en respuestas al estrés materno.** El feto recibe nutrientes de la madre a través de la placenta pero, además, recibe información biológica que le permite regular su desarrollo poniendo en marcha procesos de activación de sus genes. Esto implica que, el fenotipo fetal no viene determinada de manera exclusiva por su código genético sino que está mediado por la interacción entre el feto y su

medio (el útero materno). El estrés psicológico materno podría alterar el desarrollo fetal. Se ha descrito que, ratas gestantes sometidas a estrés tienen partos prematuros y crías de menor tamaño, con más conductas de bloqueo y defecación ante estímulos novedosos, con trastornos en su memoria espacial y con alteraciones neuroanatómicas (Weinstock, 2008). En los primates, el estrés materno da como resultado crías de menor peso (Talge et al., 2007), siendo más nocivo si los agentes estresores tienen lugar en el primer trimestre de gestación (Lazinski et al., 2008). Los estudios en humanos ponen de relieve que el malestar psicológico y la ansiedad materna juegan un papel clave sobre el desarrollo fetal. La principal conclusión es que los procesos fetales son muy sensibles a cambios en el estado emocional de la madre, de manera que no es necesario un estrés muy intenso para que el feto se vea afectado (O'Donnell et al., 2009). Las primeras consecuencias del estrés materno prenatal son la prematuridad y el bajo peso al nacer (Entringer et al., 2009).

Para que el feto responda a los estímulos que le llegan de su madre debe disponer de algún sistema de transducción que transforme las señales de activación materna en respuestas fisiológicas adaptativas. Ese sistema de transducción ha de estar en la placenta (Figura 7). La placenta es un órgano sensor y efector, programado para responder de manera flexible a las necesidades del feto.



**Figura 7.** Asociación entre el estrés materno y el estrés fetal. *Modificado de Valdés y García-Esteve, 2017.*

La placenta presenta una abundancia de receptores hormonales que regulan la actividad del eje hipotalamo-hipofisario fetal y que intervienen en la modulación de las respuestas inmunitarias (O'Donnell et al., 2012). Ante condiciones maternas de alarma

se modifica el desarrollo fetal, permitiendo su supervivencia. Así, una escasez de nutrientes en la madre produce una respuesta fisiológica adaptativa en el feto, reduciendo su crecimiento. En ocasiones, estas respuestas adaptativas tienen un coste biológico (el retraso del crecimiento fetal) y se vuelven contra los intereses del feto, aunque han permitido su supervivencia (Valdés y García-Esteve, 2017). Datos en la literatura que avalan esta reflexión son los recogidos en diversos estudios en poblaciones que sufrieron hambrunas debido a guerras u otras condiciones. Las embarazadas expuestas a la hambruna, tuvieron descendencia con bajo peso y con una mayor susceptibilidad de padecer diabetes, obesidad o enfermedades cardiovasculares en la edad adulta (Lumey, 1992). Estos y otros datos han sido publicados como capítulo del libro *Handbook of Famine, Starvation and Nutrient Deprivation* el cual se recoge en los anexos de esta Tesis Doctoral.

Cuando se produce un estrés materno, la placenta puede ocasionar una redistribución de la sangre fetal hacia el cerebro y corazón en detrimento del músculo, o el hígado (Weinstock, 2008). Al mismo tiempo, ciertas hormonas maternas (como el cortisol) o citoquinas proinflamatorias, incrementan su concentración. El paso de cortisol a través de la barrera placentaria, como se mencionó anteriormente, está limitado por la enzima 11 $\beta$ -HSD2, que lo transforma en cortisona inactiva (O'Donnell et al., 2009). Se ha propuesto que el estrés materno disminuye la actividad de esta enzima. Además, la inhibición de la 11 $\beta$ -HSD2 se ha asociado con el aumento de la prevalencia de bajo peso al nacer, prematuridad (Monk, 2001), PE (Oates, 2002) o CIR (Mulder et al., 2002). Asimismo, el aumento de citoquinas proinflamatorias maternas se ha asociado con aumento de alergias en el neonato (Merlot et al., 2008). Existen notables discrepancias sobre la etapa de la gestación en el que el estrés materno puede ser más dañino para el feto (Talge et al., 2007). Así, se ha descrito que los efectos estresantes al inicio de la gestación conllevan consecuencias como la disminución del peso de los recién nacidos o mayor riesgo de esquizofrenia, mientras que factores estresantes maternos al final de la gestación pueden promover un parto prematuro (Valdés y García-Esteve, 2017).

### *3.1. Las técnicas de reproducción asistida y sus procesos emocionales*

Someterse a una técnica de reproducción asistida (TRA) es un camino de altibajos entre la tristeza y el optimismo, la confianza y la frustración. Hay una serie de variables que median el impacto emocional que padece el sujeto, entre las que cabe destacar:

- El tipo de esterilidad padecida. Es un modulador del impacto emocional en el momento del diagnóstico. En los casos de esterilidad idiopática se produce una inestabilidad emocional (Antequera Jurado et al., 2008).
- El tiempo que la pareja lleva implicada con TRA. El tratamiento repetitivo de TRA suele implicar procesos emocionales negativos en las parejas, provocando fenómenos depresivos con emociones como culpa, expectativas anticipatorias de fracaso o baja autoestima (Moreno et al., 2007).
- La decisión de un nuevo tratamiento con TRA. Los cambios en el tipo de TRA a consecuencia de un nuevo fracaso pueden aumentar el nivel de estrés percibido (Izzedin-Bouquet de Durán, 2011).
- La presencia de abortos múltiples. Tras un embarazo TRA las expectativas de concepción parecen cumplirse, renacen ilusiones y la posibilidad de la gestación se hace presente. Por eso, la vivencia de un embarazo frustrado por un aborto tiene un fuerte impacto emocional sobre la mujer y la pareja (Guerra, 2010).

En definitiva, los embarazos TRA presentan patrones emocionales que los distinguen de los embarazos espontáneos. Por ello, se tienen en especial consideración desde el punto de vista de la intervención psicológica.

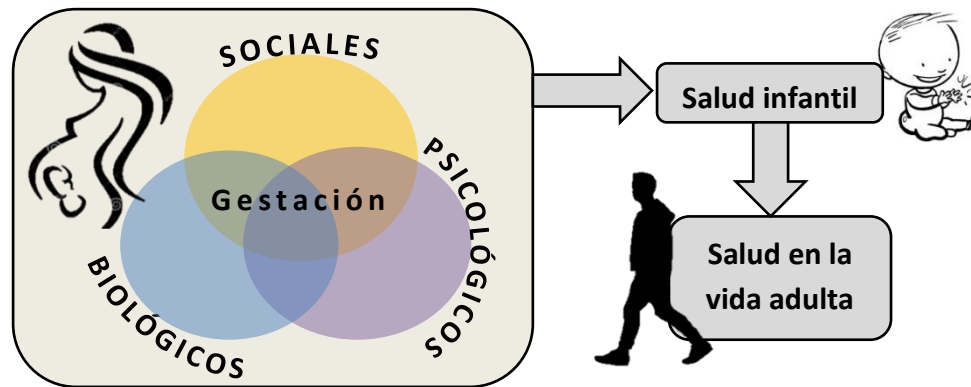


# *Hipótesis y Objetivos*

*Hypothesis & Objectives*

## 1. Justificación del estudio

La gestación es una etapa estrechamente relacionada con aspectos psicosociales y biológicos, que se encuentran íntimamente imbricados. Estos factores, no solo repercuten en la salud de la madre y del recién nacido, sino también en la salud durante la vida adulta (Figura 8).



**Figura 8.** Factores psicosociales y biológicos durante la gestación que afectan a la salud materno-fetal.

La modificación en el patrón actual de maternidad ha evidenciado que, en nuestro entorno económico hay un retraso en la edad de maternidad, lo que conlleva dos importantes consecuencias, la necesidad de utilización de técnicas de reproducción asistida y el aumento de las complicaciones obstétricas. Aunque se han descrito algunos biomarcadores asociados a complicaciones materno-fetales, la mayoría de los estudios se han realizado cuando la patología ya estaba establecida, por lo que no permiten concluir si su alteración es causa o consecuencia de la misma. Por ello, es deseable encontrar biomarcadores que permitan una detección temprana, previa al desarrollo de la patología. Por otro lado, la gestación es un periodo de cambios importantes, siendo considerada una situación de estrés, con gran influencia en el estado psicobiológico de la futura madre. La necesidad de reproducción medicalizada puede ser un estrés sobreañadido, que puede tener una influencia negativa en los patrones emocionales de la gestante y, consecuentemente, sobre la salud materno-fetal. El poder detectar de forma precoz a las gestantes con riesgo de desarrollar una complicación, permitirá realizar una intervención temprana. Así mismo, es necesaria la evaluación de los cambios psicológicos asociados al retraso en la edad de maternidad, el uso de técnicas de reproducción asistida y su influencia sobre la salud materno-fetal.

## 2. Hipótesis

Existen parámetros biológicos que permiten predecir, en una etapa temprana del embarazo, el desarrollo posterior de complicaciones materno-fetales. Estos parámetros biológicos están modulados por aspectos psicológicos.

Para evaluar esta hipótesis se plantearon los siguientes **objetivos**:

**Objetivo I.** Evaluar el contexto social de la maternidad actual, analizando:

- ✓ Aspectos socioeconómicos y educativos.
- ✓ Hábitos nutricionales y estilos de vida.
- ✓ Uso de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) y edad de maternidad.

**Objetivo II.** Evaluar los parámetros clínico-obstétricos que se indican a continuación y su relación con los aspectos sociales:

- ✓ Prevalencia de complicaciones maternas y fetales.
- ✓ Prevalencia de gestaciones gemelares y su relación con el uso de TRA.
- ✓ Peso al nacer.

**Objetivo III.** Evaluar como posibles biomarcadores tempranos de una complicación materno-fetal:

- ✓ Parámetros bioquímicos y hematológicos.
- ✓ Parámetros plasmáticos relacionados con el estado oxidativo.
- ✓ Niveles plasmáticos de hormonas (melatonina y cortisol).
- ✓ Niveles plasmáticos de citoquinas.

**Objetivo IV.** Evaluar la influencia del tipo de gestación (única o gemelar) y del tipo de reproducción (espontánea o TRA) sobre los parámetros biológicos y el desarrollo de complicaciones materno-fetales.

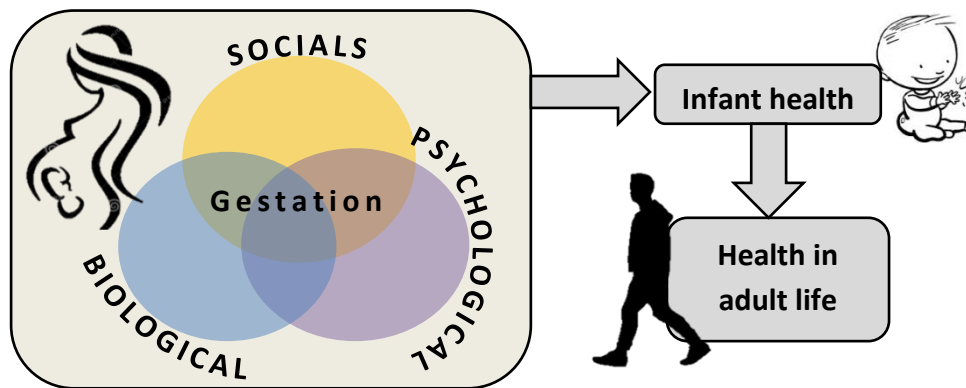
**Objetivo V.** Evaluar la influencia de las siguientes características psicológicas sobre los parámetros biológicos y clínico-obstétricos:

- ✓ Afectividad negativa y positiva.
- ✓ Ansiedad, depresión y preocupaciones gestacionales.
- ✓ Optimismo, satisfacción vital y resiliencia.
- ✓ Recursos generales y conciliación trabajo-familia.

**Objetivo VI.** Evaluar la influencia del uso de TRA sobre las características psicológicas maternas.

## 1. Rationale of the study

Gestation is a situation of important biological and psychological changes, which are closely interwoven. A healthy pregnancy is not only important for the mother and the newborn, but may also have long term consequences for the health of the offspring in adult life (Figure 8).



**Figure 8.** Psychosocial and biological factors during pregnancy that affect maternal and fetal health.

The social changes in our society have modified the pattern of maternity, the most immediate consequence being the delay in the age of first pregnancy. This has led to an increase in the need of assisted reproduction techniques and the rise in obstetric complications. Although alterations in some blood biomarkers have been found in association with maternal-fetal complications, most of the studies have been done when the pathology was already established, making it difficult to conclude whether the altered parameter is cause or consequence of the complication. Therefore, it is desirable to find biomarkers, prior to the development of the pathology, that allow early diagnosis. On the other hand, gestation is a period of important changes, being considered a stress situation, with great influence on the psychobiological state of the future mother. The need for medicalized reproduction can be an added stress, which can have a negative influence on the emotional patterns of the pregnant woman and, consequently, on maternal and fetal health. Being able to detect precociously pregnant women at risk of developing a complication, will allow for early interventions. Likewise, it is necessary to evaluate the psychological changes associated with delayed maternity age, the use of assisted reproduction techniques and their influence on maternal and fetal health.

## 2. Hypothesis

There are biological parameters that allow predicting, in early stage of pregnancy, the subsequent development of maternal and fetal complications. These biological parameters are modulated by psychological aspects.

To evaluate this hypothesis, the following **objectives** have been proposed:

**Objective I.** To evaluate the current social context of maternity, analyzing:

- ✓ Socioeconomic and educational aspects.
- ✓ Nutritional habits and lifestyles.
- ✓ Use of Assisted Reproduction Techniques (ART) and age of maternity.

**Objective II.** To evaluate the following clinical and obstetric parameters and their relationship with social aspects:

- ✓ Prevalence of maternal and fetal complications.
- ✓ Prevalence of twin gestations and their relation to the use of ART.
- ✓ Birth weight.

**Objective III.** To evaluate as possible early blood biomarkers of maternal and fetal complications:

- ✓ Biochemical and hematological parameters.
- ✓ Plasma parameters related to the oxidative status.
- ✓ Plasma levels of hormones (melatonin and cortisol).
- ✓ Plasma levels of cytokines.

**Objective IV.** To evaluate the influence of the type of gestation (single or twin) and the type of reproduction (spontaneous or ART) on the biological parameters and the development of maternal and fetal complications.

**Objective V.** To evaluate the influence of the following psychological characteristics on the biological and clinical and obstetric parameters:

- ✓ Negative and positive affectivity.
- ✓ Anxiety, depression and gestational concerns.
- ✓ Optimism, life satisfaction and resilience.
- ✓ General resources and work-family conflicts.

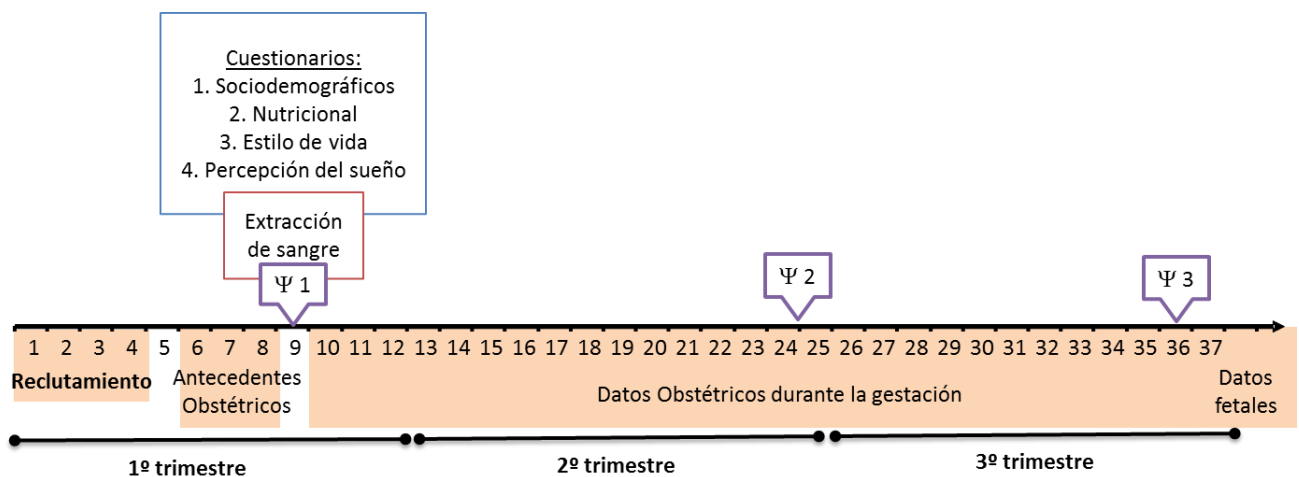
**Objective VI.** To assess the influence of the use of ART on maternal psychological characteristics.

# *Material y Métodos*

## 1. Población de estudio

El estudio se enmarca dentro de la Comunidad Autónoma de Madrid (España). Se reclutaron un total de 200 mujeres embarazadas que fueron atendidas en el servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario La Paz (HULP) en su primera visita y que desearon participar en el estudio de forma voluntaria y anónima. Los criterios de exclusión fueron la presencia de factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (hipertensión, hipercolesterolemia, arritmias, etc.) o enfermedades infectocontagiosas en el momento del inicio del estudio. Las mujeres firmaron un consentimiento donde se les informaba de la finalidad del estudio y se les pedía la cesión de una muestra de sangre que se obtendría en el mismo momento que se realizan la analítica de cribado del primer trimestre, así como el acceso a los datos de su historia clínico-obstétrica. En el consentimiento informado se explicaba que los datos serían tratados de forma estrictamente confidencial. Un esquema de los distintos datos que se recogieron se representa en la figura 9.

El estudio fue realizado de acuerdo con la declaración de Helsinki para estudios en sujetos humanos y tuvo la aprobación tanto del Comité Ético del HULP como del Comité Ético de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM).



**Figura 9.** Esquema de la temporalidad en la recogida de datos/muestras de las mujeres que aceptaron participar en el estudio.  $\Psi$ , aplicaciones psicológicas.

### 1.1. Datos clínico-obstétricos

Las mujeres entraron en el estudio durante las 4 primeras semanas de gestación. Desde este momento y hasta el parto, se recogieron datos referidos a su historia clínica distribuidos en:

**Antecedentes obstétricos.** Embarazos y abortos previos, también se recogieron datos de talla (cm) y peso (kg).

#### **Datos obstétricos durante la gestación.**

- Años de esterilidad
- Uso de Técnicas de Reproducción Asistida (TRA) y tipo
- Tipo de gestación (única o gemelar)
- Ganancia de peso (kg) por trimestre
- Diagnóstico de complicaciones leves (colestasis intra-hepática, dermatopatías, anemia gestacional o hiperémesis gravídica)
- Diagnóstico de complicaciones severa:
  - Hipertensión gestacional (HTG) definida como presión arterial por encima de 140/110 mmHg sin alteraciones de preclamsia.
  - Preeclamsia (PE) definida como hipertensión gestacional con proteinuria o trombocitopenia después de la semana 20 de gestación.
  - Diabetes gestacional (DMG) definida como niveles de glucosa por encima de 140 mg/dl en la prueba de tolerancia a la glucosa.
- Edad gestacional (semanas).

Las mujeres que desarrollaron algún tipo de complicación materna durante la gestación se consideraron como grupo de complicaciones maternas; el grupo de complicaciones maternas severas incluye las mujeres que sólo fueron diagnosticadas de alguna de las patologías severas.



**Datos fetales.**

- Abortos
- Diagnóstico de crecimiento intrauterino retardado (CIR) definido como crecimiento por debajo del percentil 3 o inferior al percentil 10 con alteraciones hemodinámicas en eco-Doppler
- Prematuridad ( $\leq 37$  semanas de gestación)

El grupo considerado como complicaciones fetales fue la agrupación entre los embarazos que presentaron CIR y/o prematuridad.

- Al nacimiento:
  - Sexo
  - Peso (gr) del recién nacido categorizado de acuerdo a los estándares como normopeso ( $\geq 2500$  gr, en embarazos únicos;  $\geq 2000$  gr, en embarazos gemelares), bajo peso ( $< 2500$  gr, en embarazos únicos;  $< 2000$  gr, en embarazos gemelares) o muy bajo peso (inferior a 1500 gr)

## 2. Cuestionarios sociodemográficos, nutricional, de estilos de vida y de percepción del sueño

Durante la semana 9 de gestación, las mujeres contestaron a los siguientes cuestionarios:

### Características sociodemográficas y situación económica al ingreso del estudio

- **Características sociodemográficas.** Edad, origen, nacionalidad y lugar de residencia, estudios, casa en propiedad, estado civil, convivencia familiar.
- **Situación económica.** Situación laboral personal, situación laboral de la pareja e ingresos del núcleo familiar (€/mensuales) categorizados como: menos de 1000, entre 1001 y 2000, entre 2001 y 3000, y más de 3000.

### Hábitos nutricionales y estilos de vida durante los últimos 5 años previos al embarazo

- **Estilos de vida.** Consumo de tabaco y frecuencia (cigarrillos/día), consumo de alcohol y periodicidad (esporádicamente, los fines de semana o de forma diaria), y consumo habitual de fármacos clasificados dentro de analgésicos, antidepresivos o tranquilizantes.
- **Hábitos nutricionales.** Comidas completas que realizaba diariamente (desayuno, media mañana, comida, merienda y cena), número de vasos de agua y consumo de refrescos al día, tipo de aceite que consumía habitualmente. También se consultó el uso de suplementos polivitamínicos y ácido fólico. La frecuencia de consumo de frutas/zumos naturales, verduras/ensaladas y lácteos se categorizó en: nunca, semanal (1-2 veces/semana o 3-6 veces/semana) o diaria (1-2 veces/día).

### Percepción del sueño durante el último mes

Se valoraron dos aspectos subjetivos del sueño:

- **Satisfacción del sueño.** Se les pedía que valorasen su satisfacción con el descanso y/o sueño, las dificultades para conciliar el sueño a la semana, presencia de somnolencia diurna a la semana, número de veces que se despierta por las noches y causa.
- **Eficacia del sueño.** Parámetro que valora las horas que permanecía dormida frente a las horas que estaba en la cama y se categoriza en porcentajes de  $\geq 81\%$  o  $\leq 80\%$ .

### 3. Extracción de sangre y su análisis

Durante la semana 9 las mujeres cedían una muestra de sangre coincidiendo con la misma extracción para la analítica del cribado combinado del primer trimestre. Esta analítica rutinaria analiza el riesgo relativo estimado de presentar trisomía de los cromosomas 13, 18 y 21. Las muestras de sangre fueron extraídas entre las 8:00 y las 9:00 am. Siguiendo los protocolos establecidos por el personal médico, la extracción (8 ml) se realizó por venopunción en tubos *BD Vacutainer*<sup>®</sup> que contenían litio-heparina y un gel separador PSTTM II. El plasma se obtuvo por centrifugación (2100 g, 15 minutos, 4°C), sin que trascurrieran más de 2 horas desde su extracción. El plasma fue alícuotado y almacenado a -80°C hasta su uso.

#### 3.1. Bioquímica y hematología

Se realizó la analítica de rutina por el servicio de Análisis Clínico del HULP. Se analizaron los siguientes parámetros:

- **Bioquímicos.** Glucosa (mg/dl), colesterol total (mg/dl), triglicéridos (mg/dl), alanina-transferasa (ALA-T; UI/L), bilirrubina total (mg/dl), ácido úrico (mg/dl), hormona estimulante de la tiroides (TSH; mUI/L).
- **Hematológicos.** Hemoglobina (g/dl), hematíes ( $10^6$ /ml), hematocrito (%), leucocitos ( $10^6$ /ml) y plaquetas ( $10^3$ /ml).

#### 3.2. Determinación de antioxidantes plasmáticos

Todos los reactivos fueron adquiridos en Sigma-Aldrich<sup>®</sup>. Todos los parámetros de estado oxidativo fueron relativizados al contenido de proteínas totales de la muestra, a excepción de las determinaciones de compuestos fenólicos y del malondialdehído plasmático que fueron relativizados al volumen de la muestra.

##### Determinación del contenido de proteínas totales del plasma

Se midió empleando el método de Bradford, adaptado a un lector de placas. Siguiendo las indicaciones del fabricante, 10  $\mu$ l de muestra diluida en agua Milli-Q Plus (1:400, v/v) se hizo reaccionar con 200  $\mu$ l del reactivo Bradford (*Protein Assay*, colorante azul de Coomassie) diluido 4 veces en agua Milli-Q Plus (v/v); transcurrido 2 minutos se midió la absorbancia a 595 nm en un lector de placas (Synergy<sup>TM</sup> HT; BioTek, UK). La

concentración de proteínas (mg/ml) se estimó a partir de una recta de calibrado con albumina de suero bovino (BSA) en el rango de 0.1 a 0.5 mg/ml.

### 3.2.1. Determinación de la actividad de captación de $O_2^{\bullet-}$ (SOSA)

El método SOSA (*Superoxide Anion Scavenging Activity*) se basa en la utilización de la sonda coelenterazina (CTZ), que se oxida por la unión al anión superóxido, dando coelenteramida (CTA), que emite luz azul. En presencia de los antioxidantes de una muestra se produce inhibición de la luminiscencia, que puede ser detectado mediante un luminómetro de microplaca. El antioxidante que más contribuye a la inhibición de la luminiscencia es la Superóxido Dismutasa (SOD), en sus distintas isoformas, por lo que este método se emplea para determinar la actividad SOD total.

#### Protocolo experimental

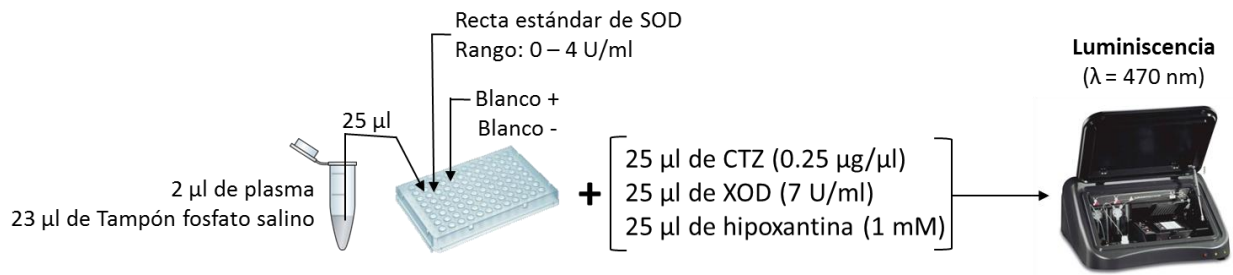
Se preparó tampón fosfato salino (100 mM; pH = 7.4). A continuación se cargaron en una placa de 96 pocillos, se cargaron 25  $\mu$ l de la muestra de plasma diluida en dicho tampón (1:25, v/v), los diferentes puntos de la recta estándar de Superóxido Dismutasa (SOD) -en el rango de 0 a 4 U/ml- seguido de 25  $\mu$ l de sonda de luminiscencia (CTZ, 0.25  $\mu$ g/ $\mu$ l), 25  $\mu$ l de xantina oxidasa (XOD, 7 U/ml) y, finalmente, 25  $\mu$ l de hipoxantina (1 mM). A continuación, se midió la luminiscencia a 470 nm en un luminómetro de placa (GloMax<sup>®</sup> 96, Promega, USA). Para las disoluciones de xantina oxidasa y de hipoxantina se empleó KEPT (0.4%, v/v Triton<sup>®</sup> X-100 + EGTA 0.1 mM en tampón fosfato salino). Se cargaron los blancos de la siguiente manera:

- Blanco positivo: 25  $\mu$ l de tampón fosfato salino, 25  $\mu$ l de XOD, 25  $\mu$ l de CTZ y 25  $\mu$ l de hipoxantina.
- Blanco negativo: 50  $\mu$ l de tampón fosfato salino, 25  $\mu$ l de KEPT y 25  $\mu$ l de CTZ.

#### Cálculos

Los valores de luminiscencia de las muestras/SOD se convirtieron a valores de inhibición mediante la ecuación (1). El valor SOSA de las muestras se expresó en unidades de SOD/mg de proteína total, estimada a partir de la recta estándar de calibrado de SOD (inhibición de luminiscencia versus logaritmo de SOD de 0 a 3 U SOD/ml). Protocolo adaptado de (Saleh y Plieth, 2010) (Figura 10).

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



**Figura 10.** Protocolo experimental para el método SOSA (*Superoxide Anion Scavenging Activity*). SOD, *Superóxido Dismutasa*; CTZ, *Coelenterazna*; XOD, *Xantina Oxidasa*.

### 3.2.2. Determinación de la actividad catalasa

El compuesto 10-acetil-3,7-dihidroxi-fenoxazona (sonda *Amplex® Red*) se oxida a resorufina en presencia de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y peroxidasa de rábano (HRP). La resorufina es un compuesto fluorescente con un máximo de excitación a 530 nm y un máximo de emisión a 590 nm. 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

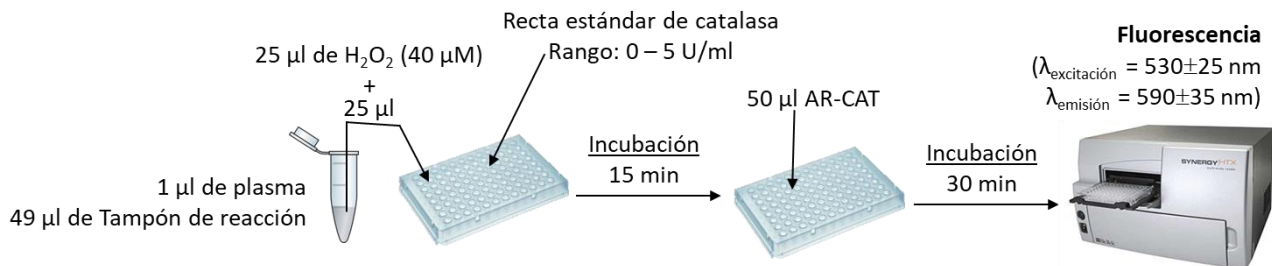
Se preparó tampón de reacción (Tris Base 1X, pH = 7.5 disuelto en agua Milli-Q Plus). Se cargaron en una placa de 96 pocillos, 25 µl de plasma diluido en tampón de reacción (1:50, v/v) y 25 µl de tampón de reacción como blanco. Se añadieron 25 µl de  $H_2O_2$  (40 µM, disuelto en tampón de reacción), se incubó la placa a 37°C durante 15 minutos, trascurrido ese tiempo, se adicionó 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 ( $\lambda_{\text{excitación}} = 530 \pm 25$  nm y  $\lambda_{\text{emisión}} = 590 \pm 35$  nm) en un lector de placas (Synergy™ HT, BioTek, UK).

### 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 (Figura 11).

$$(2) \text{ Inhibición de Fluorescencia} = 1 - \frac{\text{Fluorescencia}_{\text{muestra/catalasa}}}{\text{Fluorescencia}_{\text{blanco}}}$$

Siendo:  $\text{Fluorescencia}_{\text{blanco}}$ , fluorescencia en ausencia de catalasa.



**Figura 11.** Protocolo experimental para la determinación de actividad catalasa de las muestras. AR-CAT, sonda Amplex® Red, peroxidasa y tampón de reacción.

### 3.2.3. Determinación de glutatión reducido (GSH)

El O-Ftaldehído (OPT) es un dialdehído capaz de reaccionar con aminas primarias o grupos sulfhídricos en presencia de grupos tiólicos, generando restos fluorescentes con un máximo de excitación a 360 nm y un máximo de emisión a 460 nm (Hissin y Hilf, 1976).

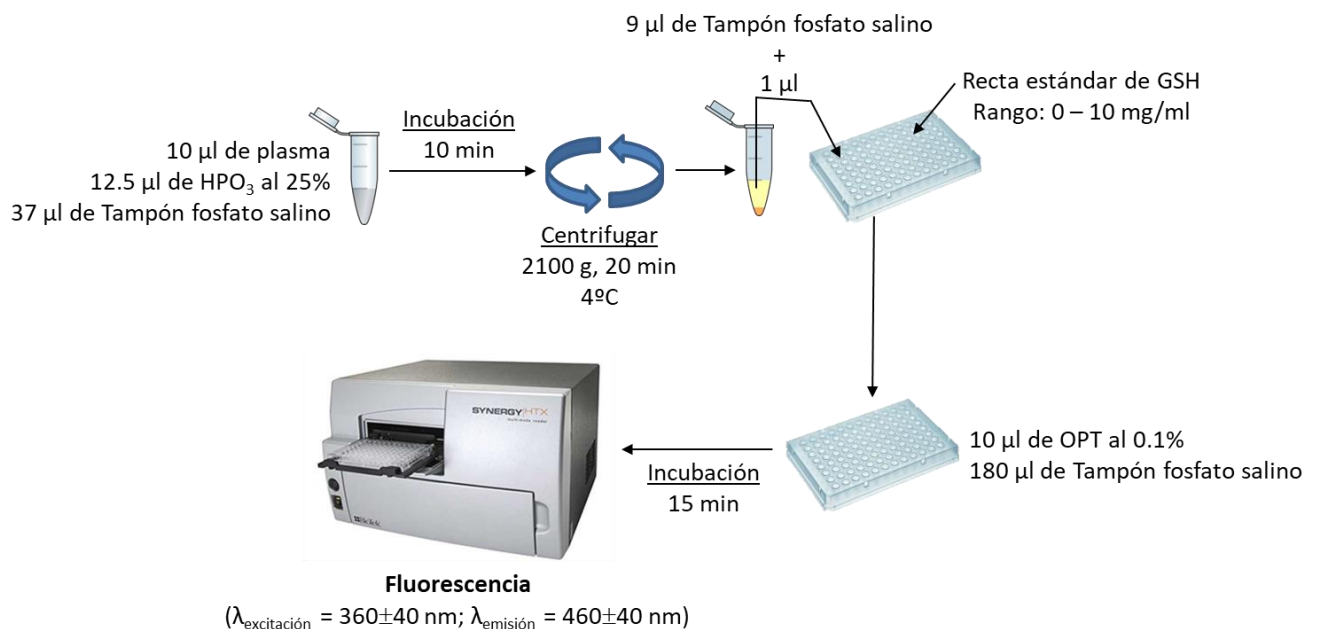
#### Protocolo experimental

El método original, con algunas modificaciones, se adaptó a un lector de placas. Se preparó tampón fosfato salino (0.1 M, pH=8) con EDTA (5 mM) y ácido metafosfórico (HPO<sub>3</sub>) al 25 % (p/v diluido en agua Milli-Q Plus), se hicieron reaccionar 10 µl de la muestra de plasma con 12.5 µl de HPO<sub>3</sub> al 25% y 37 µl de tampón fosfato salino. 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 L-Glutation reducido (GSH) en tampón fosfato como recta estándar. Se añadieron a todos los pocillos 180  $\mu\text{l}$  de tampón fosfato salino y 10  $\mu\text{l}$  de OPT al 0.1% (p/v diluido en metanol). Tras incubar la muestra de plasma y los reactivos a temperatura ambiente durante 15 minutos en ausencia de luz, 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<sup>TM</sup> HT, BioTek, UK).

### 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 en el rango de 0 a 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 (Figura 12).



**Figura 12.** Protocolo experimental para la determinación de glutatión reducido (GSH) de las muestras. OPT, O-Ftaldehído.

### 3.2.4. Determinación de grupos tioles

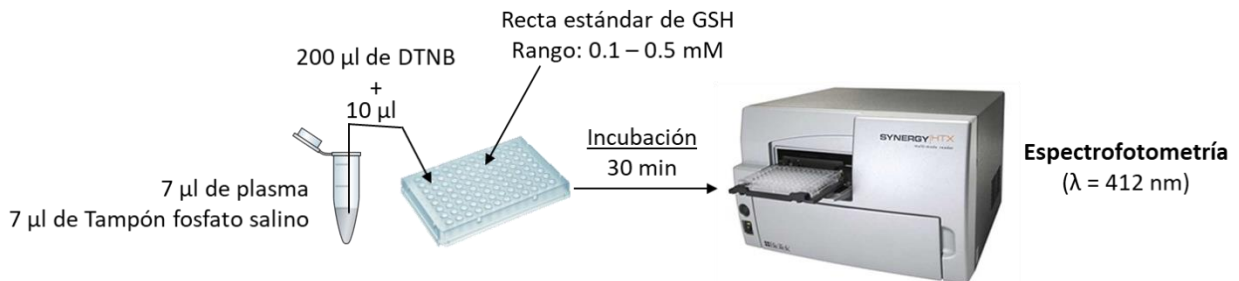
Los grupos tiólicos son capaces de reaccionar con el reactivo de Ellman (ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico, DTNB) generando el ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB), el cual puede ser cuantificado a 412 nm en un espectrofotómetro UV/visible (Hawkins et al., 2009).

#### Protocolo experimental

Se cargaron 10  $\mu$ l de muestra de plasma diluida en tampón fosfato salino (1:2, v/v; pH = 7.4) en una placa de 96 pocillos. Se añadieron 200  $\mu$ l de DTNB (0.5 mM, diluido en tampón fosfato salino). Se agitó la placa durante 1 minuto y seguidamente se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 30 minutos todo ello en oscuridad. Se leyó la absorbancia a 412 nm en un lector de placas (Synergy<sup>TM</sup> HT, BioTek, UK; Figura 13).

#### Cálculos

La cuantificación de tioles totales se estimó a partir de una recta estándar cargando 10  $\mu$ l de diluciones de L-Glutation (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.



**Figura 13.** Protocolo experimental para la determinación de grupos tioles de las muestras. DTNB, ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzónico; GSH, Glutación reducido.

### 3.2.5. Determinación de compuestos fenólicos

Se valoraron de forma global los fenoles presentes en la muestra de plasma, utilizando un método basado en el carácter reductor de los mismos. La cuantificación se realiza por la medida del complejo azul formado por la oxidación del grupo hidroxilo de los compuestos fenólicos con el reactivo de Folin-Ciocalteu (compuesto formado por una mezcla de ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico) a pH básico (Torabian et al., 2009).

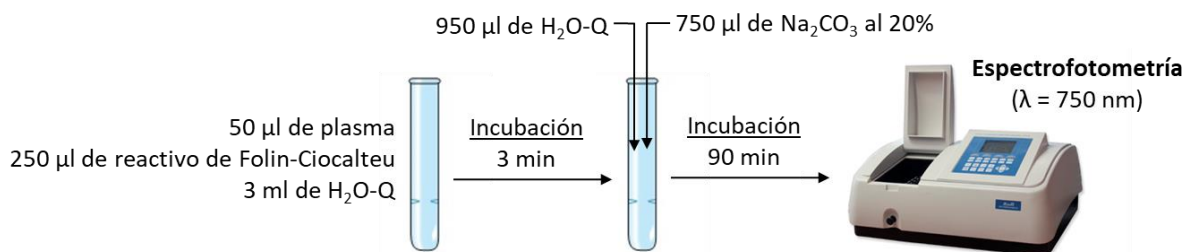


### Protocolo experimental

Para dicha determinación se procedió según el método descrito previamente por (Xu y Chang, 2008) con algunas modificaciones. Previo al ensayo, se hacen reaccionar en un tubo de ensayo 400  $\mu\text{l}$  de HCl (1 M, v/v disuelto en agua Milli-Q Plus) con 200  $\mu\text{l}$  de muestra de plasma/puntos de la recta estándar y se incuban durante 30 minutos a 37°C. Se añade al tubo de ensayo 400  $\mu\text{l}$  de NaOH (2 M, p/v disuelto en metanol al 75%) y se incuban durante 30 minutos a 37°C, se añaden 400  $\mu\text{l}$  de HPO<sub>3</sub> (0.75 M, p/v disuelto en agua Milli-Q Plus) y se centrifugan los tubos a 3800 rpm durante 10 minutos a 18°C. El sobrenadante se pasó por un filtro de nailon estéril Millex® de 0.45  $\mu\text{m}$ . En un tubo de ensayo limpio se hacen reaccionar 3 ml de agua Milli-Q Plus, 50  $\mu\text{l}$  de muestra de plasma/puntos de la recta estándar (filtrada) y 250  $\mu\text{l}$  de reactivo Folin-Ciocalteu. Se mezcla con agitador y se deja reposar durante 3 minutos a temperatura ambiente y en ausencia de luz. A continuación, se añaden 750  $\mu\text{l}$  de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20%, p/v disuelto en agua Milli-Q Plus) y 950  $\mu\text{l}$  de agua Milli-Q Plus, se agita de nuevo y se incuban en oscuridad durante 90 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se mide la absorbancia a 750 nm en un lector de placas (Synergy™ HT, BioTek, UK).

### Cálculos

Para la realización de la curva estándar de calibrado se utilizaron patrones con concentraciones comprendidas entre 50 a 1000 mg/L de ácido gálico (GAE). Los resultados se expresan como mg de GAE/L (Figura 14).



**Figura 14.** Protocolo experimental para la determinación de compuestos fenólicos tras la precipitación de ácidos grasos (con NaOH 2M) y proteínas (con HPO<sub>3</sub> 0,75M) de las muestras.

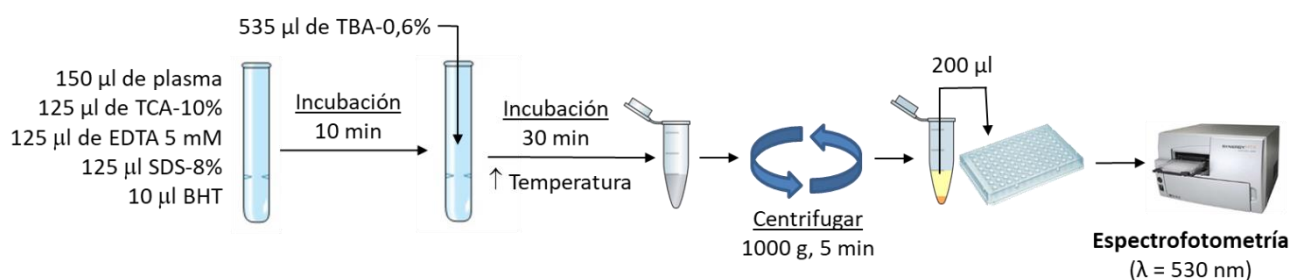
### 3.3. Determinación de daño oxidativo plasmático

#### 3.3.1. Medida de Malondialdehído (MDA)

La medida de MDA-TBA se consideró un método sensible para la determinación de la peroxidación lipídica (Draper y Hadley, 1990). El método analítico se basa en la reacción del MDA presente en la muestra con el ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). En condiciones de pH ácido y alta temperatura da lugar al compuesto MDA-TBA de color rojizo que es detectable por espectrofotometría con un máximo de absorbancia a 530 nm.

#### Protocolo experimental

Se hicieron reaccionar 150  $\mu\text{l}$  de plasma con 125  $\mu\text{l}$  de ácido tricloroacético (TCA al 10%, p/v disuelto en agua Milli-Q Plus), 125  $\mu\text{l}$  de EDTA (5 mM), 125  $\mu\text{l}$  de dodecil sulfato sódico (SDS al 8%, p/v disuelto en agua Milli-Q Plus) y 10  $\mu\text{l}$  de hidroxitolueno butilado (BHT 500 ppm disuelto en etanol absoluto). La mezcla se incubó a temperatura ambiente en ausencia de luz durante 10 minutos. Trascurrido el tiempo de incubación, se añadió a la reacción 535  $\mu\text{l}$  de TBA (al 0.6% p/v disuelto en agua Milli-Q Plus). Las muestras se incubaron en ausencia de luz durante 30 minutos al baño maría con una temperatura superior a los 90°C. Después de una centrifugación a 10000 g durante 5 minutos a temperatura ambiente se cargaron 200  $\mu\text{l}$  del sobrenadante en una placa de 96 pocillos y se midió la absorbancia a 530 nm en un lector de placas (Synergy™ HT, BioTek, UK; Figura 15).



**Figura 15.** Protocolo experimental para la determinación de malondialdehído (MDA). TCA, Ácido Tricloroacético; EDTA, Ácido tetracético de etilendiamida; SDS, Dodecil sulfato sódico; BHT, Hidroxitolueno butilado; TBA, ácido 2-tiobarbitúrico.

### Cálculos

El contenido de MDA en la muestra se expresó en  $\mu\text{mol/L}$  a partir de la recta de calibrado cargando 200  $\mu\text{l}$  de diluciones de MDA en agua Milli-Q Plus (v/v) en el rango de 0 a 9.89  $\mu\text{mol/L}$  (Figura 15).

### 3.3.2. Medida de grupos carbonilos

La presencia de grupos carbonilos en las proteínas es indicativo de procesos oxidativos. La 2,4-Dinitrofenilhidrazona (DNPH) es capaz de reaccionar con los grupos carbonilos de las proteínas, generando un compuesto que puede ser detectado por espectrofotometría con un máximo de absorbancia a 370 nm (Hawkins et al., 2009).

### Protocolo experimental

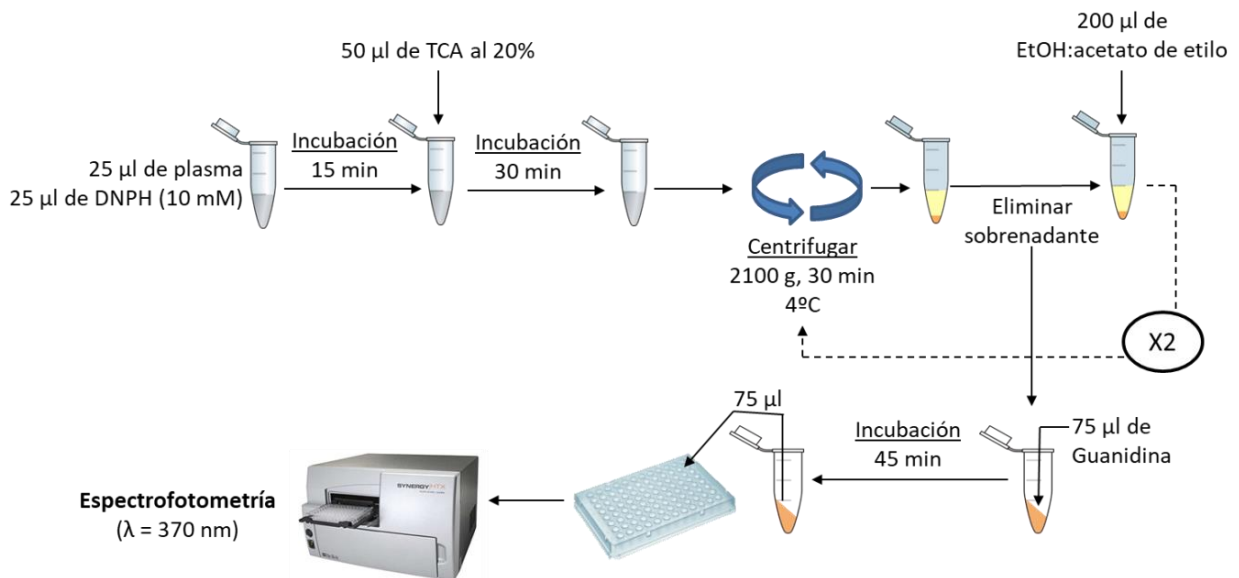
Se mezclaron 25  $\mu\text{l}$  de plasma con el mismo volumen de DNPH (10 mM) disuelto en HCl (2.5 M, v/v disuelto en agua Milli-Q Plus). La mezcla se incubó a temperatura ambiente y en ausencia de luz durante 15 minutos. Cada 5 minutos se agitó la mezcla vigorosamente para favorecer la reacción entre los grupos carbonilos y el DNPH. Para precipitar las proteínas plasmáticas se añadió a la reacción 50  $\mu\text{l}$  de TCA al 20%, p/v disuelto en agua Milli-Q Plus y se incubaron las muestras en ausencia de luz durante 30 minutos en frío. Mediante centrifugación a 2100 g durante 30 minutos a 4°C, se obtuvieron los precipitados proteicos, los cuales se lavaron con 200  $\mu\text{l}$  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). Posteriormente, los precipitados se disolvieron en 75  $\mu\text{l}$  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 ausencia de luz. Se cargaron 75  $\mu\text{l}$  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).

### Cálculos

La concentración de proteínas carboniladas totales (PCT) se determinó mediante las ecuaciones (3). Las unidades de PCT fueron nmol/mg de proteína total (Figura 16).

$$(3) PCT = \left[ \frac{ABS_{370 \text{ nm}}}{\epsilon_{DNPH} \cdot b} \right] \cdot 10^6$$

Siendo:  $\varepsilon_{DNP\text{H}}$ , 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).



**Figura 16.** Protocolo experimental para la determinación proteínas carboniladas totales. *DNP\text{H}*, 2,4-Dinitrofenilhidrazona; *TCA*, Ácido Tricloroacético; *EtOH*, Etanol absoluto.

### 3.4. Cálculo para la determinación de índices (Scores)

El cálculo utiliza la normalización y estandarización de los parámetros de interés, lo que permite sumar parámetros con distintas unidades de medidas (Condezo-Hoyos et al., 2013). En primer lugar, se analizó la normalidad de cada parámetro ( $j$ ) mediante la prueba Kolmogorove-Smirnov y se normalizaron aquellos parámetros que no mostraron una distribución normal mediante una transformación logarítmica ( $\log j$ ). posteriormente, el parámetro se estandarizó para cada sujeto ( $i$ ) de acuerdo con la ecuación (4).

$$(4) Z_{ij} = \frac{X_{ij} - \bar{X}_j}{\sigma_j}$$

Siendo:  $Z_{ij}$ , parámetro estandarizado;  $X_{ij}$ , parámetro normalizado sin procesar para cada sujeto;  $\bar{X}_j$ , media de la población;  $\sigma_j$ , desviación estándar de la población.

- **Estado antioxidante global en plasma (Antiox-S).** El conjunto de antioxidantes medidos, se integró en un parámetro global denominado Antiox-S. Este parámetro se calculó individualmente para cada embarazada según la ecuación (5).

$$(5) \text{ AntioxS} = \frac{\Sigma(zSOSA + zCatalasa + zGSH + zTioles + zFenoles)}{5}$$

- **Daño oxidativo plasmático global (Prooxy-S).** El conjunto de biomarcadores de daño oxidativo se integró en un parámetro global denominado Prooxy-S. Este parámetro se calculó individualmente para cada embarazada según la ecuación (6).

$$(6) \text{ ProoxyS} = \frac{\Sigma(zMDA + zGrupos\ carbonilos)}{2}$$

- **Balance oxidativo plasmático global (Global-S).** Se aplicó la ecuación (7) de forma individualizada para cada embarazo.

$$(7) \text{ GlobalS} = \text{AntioxS} - \text{ProoxyS}$$

### 3.5. Determinación de hormonas en plasma

#### 3.5.1. Determinación de melatonina

El procedimiento de ensayo sigue el principio básico de los ensayos ELISA competitivos, donde el antígeno biotinilado en la placa y el no biotinilado de la muestra compiten por un número fijo de sitios de unión. La cantidad del antígeno de melatonina biotinilada unida al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración de melatonina de la muestra.

#### Protocolo experimental

Previo al ensayo ELISA, la muestra de plasma debe ser purificada mediante columnas de sílice de extracción C-18 (Sep-Pack®) y la ayuda de una cubeta Baker Spe-126 (sistema de purificación SPE-manifold). Las etapas de purificación fueron:

- 1) *Acondicionamiento*: 1 ml de metanol seguido de 1 ml de agua Milli-Q Plus), carga (0.5 ml de muestra de plasma, puntos de la recta estándar o muestras controles junto con 0.5 ml de agua Milli-Q Plus.
- 2) *Lavado*: 2 veces 1 ml de metanol al 10%, v/v diluido en agua Milli-Q Plus.
- 3) *Elución*: en 1 ml de metanol.

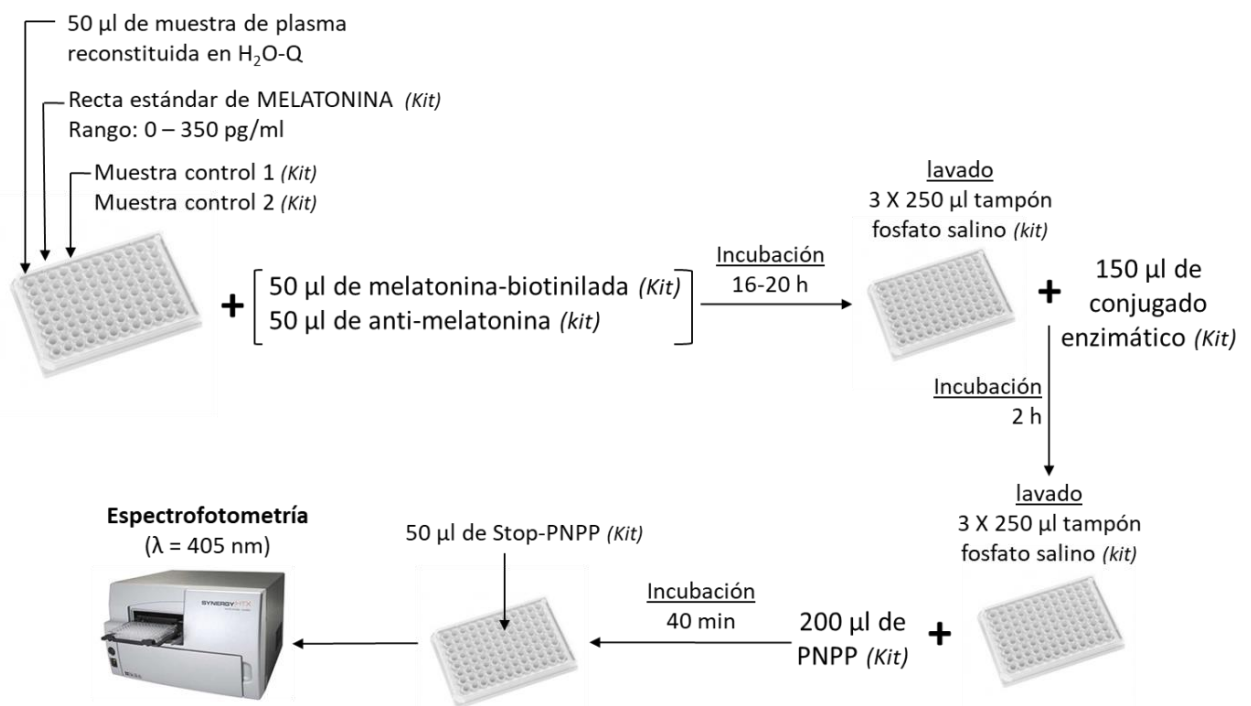
Posteriormente, para conseguir la evaporación de las muestras, se centrifugan durante 4 horas en una centrífuga de vacío (SaVant®) y se reconstituyen en 150 µl de agua Milli-Q Plus.

Los niveles de melatonina se determinaron a partir del kit de inmunoensayo enzimático Melatonina ELISA (IBL-international, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. A la placa 96 pocillos de micro-titulación, recubierta con IgG anti-conejo se añaden 50 µl de cada muestra de plasma, la curva estándar o las muestras controles, 50 µl de melatonina biotinilada y 50 µl de antisuero de melatonina, se deja incubar durante 16-20 horas a 4°C en ausencia de luz. Transcurrido este tiempo, se realizan 3 lavados con tampón fosfato salino, se añade 150 µl de conjugado enzimático (estreptavidina) y se mantiene 2 horas a temperatura ambiente en ausencia de luz en un agitador orbital. Se realizan de nuevo 3 lavados con tampón fosfato salino, y se desarrolla la reacción añadiendo, como sustrato, 200 µl de p-nitrofenil (PNPP), incubando la placa durante 40 minutos a temperatura ambiente en ausencia de luz en agitador orbital. Trascendido ese tiempo, se añaden 50 µl de la

solución de parada. La absorbancia se leyó a 405 nm en un lector de placas (Synergy™ HT, BioTek, UK).

### Cálculos

La cuantificación de melatonina plasmática se estimó a partir de una recta estándar en el rango de 0 a 350 pg/ml. La muestra control 1 tiene una concentración entre 7 a 18.4 pg/ml y la muestra control 2 de entre 53.6 a 91.3 pg/ml. El contenido de melatonina plasmática se expresó en pg/ml, el cual se estimó a partir de la recta estándar (Figura 17).



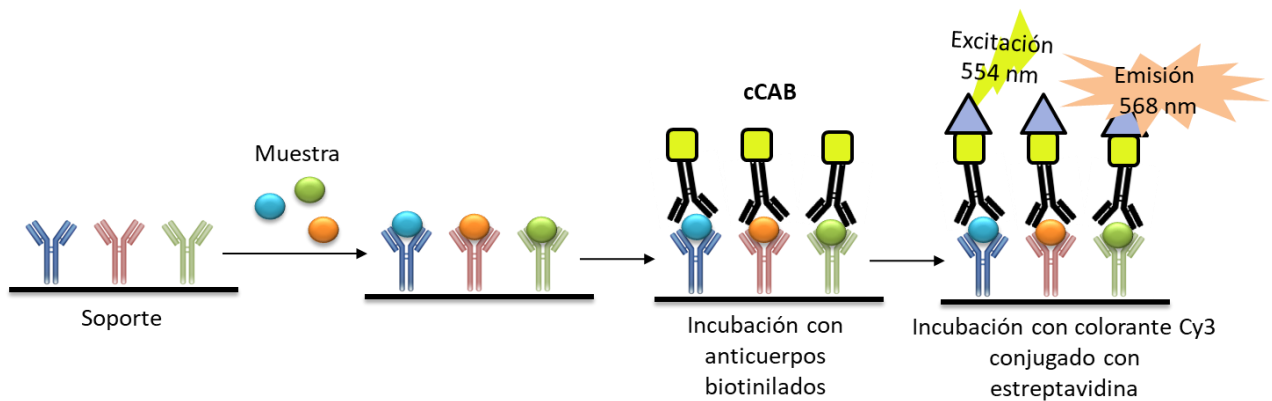
**Figura 17.** Protocolo experimental para la determinación de melatonina plasmática tras la purificación de las muestras por SPE-manifold. *PNPP*, *p-nitrofenil*; Todos los reactivos fueron facilitados por el kit Melatonina ELISA (IBL-international, Alemania).

### 3.5.2. Determinación de cortisol

Los niveles plasmáticos de cortisol fueron analizados con un inmunoensayo competitivo usando una tecnología de quimioluminiscencia directa en un sistema de detección ADVIA Centaur® (Siemens® Healthineers), proporcionado por el servicio de Análisis Clínico del HULP.

### 3.6. Determinación de citoquinas

La tecnología de los microarrays se basa en los fundamentos de las técnicas ELISA, cuantificando de forma simultánea un conjunto de proteínas con un mínimo volumen de muestra. En primer lugar, un anticuerpo de captura se une a la superficie del vidrio, tras la incubación con la muestra, la citoquina diana queda atrapada a la superficie sólida. Después se añade un segundo anticuerpo biotinilado, el cual puede reconocer un epitopo diferente en cada citoquina diana. El complejo citoquina-anticuerpo-biotina (cCAB) puede visualizarse, usando un escaneado asociado a un láser, mediante adicción de un colorante conjugado Cy3 de estreptavidina (Figura 18).



**Figura 18.** Metodología de microarrays para la cuantificación de citoquinas inflamatorias. *cCAB*, complejo citoquina-anticuerpo-biotinilado.

En concreto, el microarray empleado en este trabajo constaba de 16 pocillos por cada portaobjetos, en cada pocillo estaban insertos por cuadruplicado los anticuerpos de detección para: Interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), Interleuquina-8 (IL-8), Interleuquina-10 (IL-10), Proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) y Factor de Necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), junto con los controles positivos.

#### Protocolo experimental

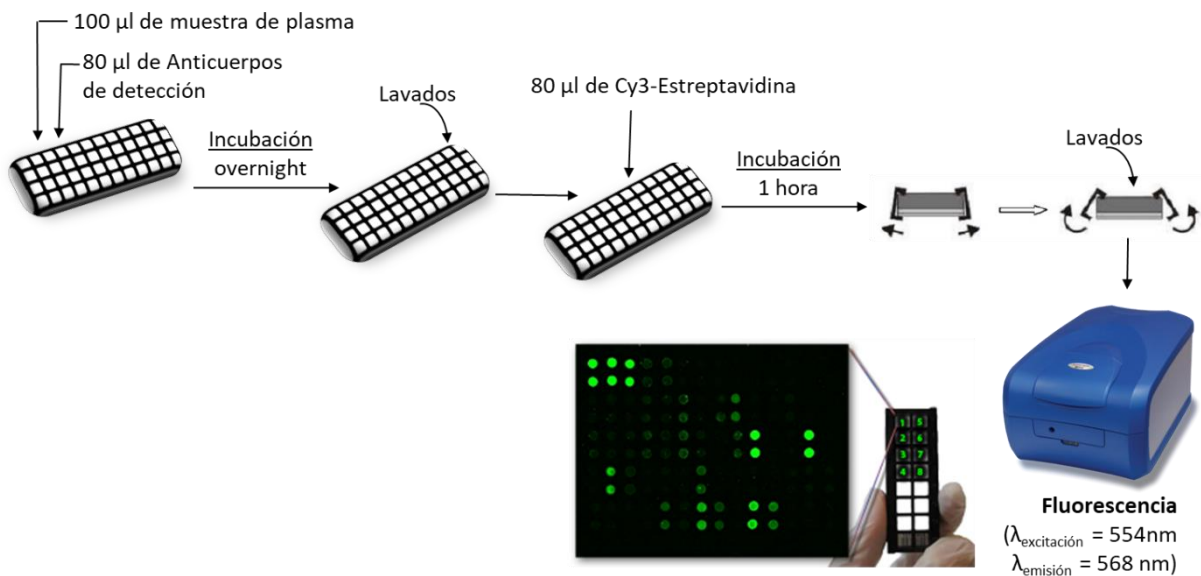
Para la cuantificación de las citoquinas inflamatorias se siguieron las indicaciones del fabricante (Quantibody® Human Inflammation Array 1; Cat. QAH-INF-1, RayBiotech). Tras la estabilización y los pasos de bloqueo del portaobjetos, en cada pocillo del portaobjetos se hicieron reaccionar 100  $\mu$ l de la muestra de plasma con 80  $\mu$ l de la solución del kit que contenía los anticuerpos de detección de las distintas citoquinas, tras dejar incubar a temperatura ambiente durante toda la noche en oscuridad se



lavarón los pocillos del portaobjetos con los buffers I y II del kit tantas veces como aconseja el fabricante. Se añadió a cada pocillo 80  $\mu\text{l}$  del conjugando Cy3 de estreptavidina del kit y se dejó incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 1 hora. Tras el desmontado del soporte que sujetaba el portaobjetos, y los pasos de lavado con los buffers I y II, se procedió a leer mediante láser (Axon GenePix™) la fluorescencia del Cy3 ( $\lambda_{\text{excitación}} = 554 \text{ nm}$  y  $\lambda_{\text{emisión}} = 568 \text{ nm}$ ).

### Cálculos

Para la cuantificación de citoquinas se empleó el software específico que recomendaba el fabricante. La recta estándar para IL-1 $\beta$ , IL-10, MCP-1 y TNF- $\alpha$  presentaron unos rangos de 0 a 2000 pg/ml y para la IL-8 tuvo un rango de 0 a 400 pg/ml. La concentración de citoquinas en las muestras se realizó por interpolación en la curva estándar. Las unidades de citoquinas se expresaron como pg/ml (Figura 19).



**Figura 19.** Protocolo experimental para la determinación de citoquinas inflamatorias por microarrays. Quantibody® Human Inflammation (RayBiotech).

#### 4. Aplicaciones psicológicas

Las mujeres contestaron varios test (aplicaciones) distribuidos en tres puntos: durante la semana 9 de gestación (considerado como 1º trimestre), en las semanas 24-25 de gestación (considerado como 2º trimestre) y durante la semana 36 de gestación (considerado como 3º trimestre). Aquellas gestaciones que sufrieron abortos o parto prematuro en las semanas anteriores a la fecha de entrega de las aplicaciones psicológicas fueron consideradas como datos perdidos. La temporalización de los cuestionarios se detalla en la tabla 2. Cada ítem de los distintos test fue valorado con escala de tipo Likert, las aplicaciones psicológicas se incluyen como anexos.

**Tabla 2.** Distribución temporal de las escalas psicológicas aplicadas en este trabajo.

Escalas Psicológicas	Trimestre de gestación		
	1º	2º	3º
Afectividad Negativa/Positiva	X	X	X
Hospitalaria de ansiedad	X	X	X
Preocupaciones durante el embarazo	X	X	X
Optimismo disposicional	X		X
Satisfacción vital		X	X
Recursos generales	X	X	
Resiliencia	X		
Conciliación del ámbito laboral y personal		X	
Hospitalaria de depresión			X

##### 4.1. Escala de afectividad negativa y positiva

*Positive and Negative Affect Schedule (PANAS)* (Watson et al., 1988).

Versión española (Moriondo et al., 2012). Esta escala evalúa la afectividad tanto positiva como negativa de la persona. Se ha usado una versión de 20 adjetivos con una escala de respuesta de tipo Likert de 5 puntos desde 1 “*muy poco o nada*” hasta 5 “*extremadamente*”. Ejemplos de adjetivos que describen el estado de ánimo negativo son “*interesada*”, “*angustiada*” y “*nerviosa*”, algunos que describen el estado de ánimo positivo son “*fuerte*”, “*activa*” y “*decidida*”. El cuestionario presentó un  $\alpha$  de Cronbach de 0.68.

#### 4.2. Escala hospitalaria de ansiedad y escala hospitalaria de depresión

*Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)* (Zigmond y Snaith, 1983)

Versión española (López-Roig et al., 2000). Esta escala evalúa la ansiedad y la depresión mediante un test con siete ítems en un formato de tipo likert de 0 a 3, variando el formato verbal en función del ítem, donde 0 es “*nada de ansiedad/depresión*” y 3 es “*mucha ansiedad/depresión*”. La escala hospitalaria de ansiedad presentó un  $\alpha$  de Cronbach de 0.84 y la escala hospitalaria de depresión 0.78.

#### 4.3. Escala de preocupaciones durante el embarazo

Debido a la ausencia de instrumentos de cuantificación en éste ámbito concreto, la escala fue elaborada por el Dr. Moreno del equipo de investigación (Facultad de Psicología-UAM). Tiene el objetivo de evaluar el nivel de preocupaciones suscitadas por el embarazo. El test consta de diez ítems con una escala de likert de 0 “*Nada*” a 3 “*Mucho*”. Ejemplos de los ítems son “*La salud y la normalidad del niño*” y “*el efecto de las medicinas sobre el feto*”. Esta escala presentó un  $\alpha$  de Cronbach de 0.82.

#### 4.4. Escala de optimismo disposicional

*Life Orientation Test (LOT)* (Scheier et al., 1994).

Versión española (Ferrando et al., 2002). Esta escala evalúa el optimismo disposicional de forma positiva y negativa. Se usó una versión reducida del test de 5 ítems con una escala Likert de 1 “*Muy en desacuerdo*” a 5 “*Totalmente de acuerdo*”. Ejemplos de los ítems son “*Siempre soy optimista acerca de mi futuro*” y “*Rara vez confío en que las cosas buenas me sucedan a mí*”. La escala presentó un  $\alpha$  de Cronbach de 0.66.

#### 4.5. Escala de satisfacción vital

*Life Satisfaction* (Diener et al., 1985).

Versión española en embarazadas (Cabañero Martínez et al., 2004). La escala evalúa el nivel de satisfacción subjetiva ante la vida en general. El test utilizado consta de 5 ítems en una escala Likert de 1 “*Totalmente en desacuerdo*” a 7 “*Totalmente de acuerdo*”. Ejemplos de los ítems son “*En general mi vida real se acerca a mi vida ideal*” y “*Si volviera a vivir creo que no cambiaría casi nada*”. La escala presentó un  $\alpha$  de Cronbach de 0.87.

#### 4.6. Escala de recursos generales

Debido a la ausencia de instrumentos de medida en éste ámbito concreto, la escala fue elaborada por el Dr. Moreno del equipo de investigación (Facultad de Psicología-UAM). Esta escala evalúa los aspectos globales económicos, sociales, de salud y relacionales de la persona. Consta de 9 ítems que evalúan los recursos generales de la persona en una escala Likert de 5 puntos que van desde 1 “*Muy de acuerdo*” (pocos recursos) a 5 “*Muy en desacuerdo*” (muchos recursos). Ejemplos de los ítems son: “*No tengo problemas económicos importantes*” y “*Tengo actividades personales muy satisfactorias*”. Este test presenta un  $\alpha$  de Cronbach de 0.86.

#### 4.7. Escala de resiliencia

*Resilience* (Wagnild y Young, 1993).

Versión española (Rodríguez et al., 2009). Esta escala evalúa la capacidad de afrontar las dificultades y problemas que se puedan presentar. Se empleó una versión reducida de 6 ítems con una escala de Likert de 1 “*Absolutamente en desacuerdo*” (poca resiliencia) a 7 “*Totalmente de acuerdo*” (bastante resiliencia). Ejemplo de los ítems son “*Ante cualquier situación generalmente me las arreglo de una manera u otra*”, “*El creen en mi misma me permite atravesar tiempos difíciles*”. El  $\alpha$  de Cronbach para esta escala fue de 0.66.

#### 4.8. Escala de conciliación del ámbito laboral y personal

Debido a la ausencia de instrumentos de medida en éste ámbito concreto, la escala fue elaborada por el Dr. Moreno del equipo de investigación (Facultad de Psicología-UAM). Esta escala evalúa la capacidad para conciliar la vida laboral con el ámbito personal. El test consta de 6 ítems con una escala de Likert de 0 “*Nunca*” (máxima conciliación) a 3 “*Siempre*” (nula conciliación). Algunos ejemplos de ítem fueron: “*Está irritable en casa porque su trabajo es muy agotador*” o “*Tiene que cancelar planes con su pareja/familia/amigos debido a compromisos laborales*”. Este test presentó un  $\alpha$  de Cronbach de 0.88.

A continuación, se presenta un resumen de los test/escalas de las aplicaciones psicológicas empleadas en esta tesis doctoral que se recogen en los anexos (Tabla 3).

**Tabla 3.** Escalas psicológicas empleadas en este trabajo.

Variable	Instrumento/escala	Autores	Ítems	Rango
Afectividad Negativa/Positiva	Positive and Negative Affect Schedule (PANAS)	Watson et al., 1988 Versión española (Moriondo et al., 2011)	20	1 - 5
Ansiedad	The Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)	Zigmond y Snaith, 1983. Versión española (Lopez-Roig et al. 2000)	7	0 - 3
Depresión	The Hospital Anxiety and Depression Scale (HADS)	Zigmond y Snaith, 1983. Versión española (Lopez-Roig et al. 2000)	7	0 - 3
Preocupaciones	Preocupaciones del embarazo	Creada ad hoc para el estudio	10	0 - 3
Optimismo disposicional	Life Orientation Test (LOT)	Scheier et al., 1994 Versión española (Ferrando et al., 2002)	5	1 - 5
Satisfacción vital	Life Satisfaction	Diener et al., 1985 Versión española (Cabañero Martínez et al., 2004)	5	1 - 7
Recursos	Recursos generales	Creada ad hoc para el estudio	9	1 - 5
Resiliencia	Resilience	Wagnild y Young, 1993 Versión española (Rodríguez et al., 2009)	6	1 - 7
Conciliación trabajo-familia	Conciliación del ámbito laboral y personal	Creada ad hoc para el estudio	6	0 - 3

## 5. Análisis estadístico

Se utilizó el programa estadístico SPSS Statistics versión 24 (IBM Company). Los datos de las variables que mostraron una distribución normal se expresaron como la media  $\pm$  el error típico como medida de dispersión (o desviación estándar en el análisis descriptivo). Los datos de variables que no seguían una distribución normal fueron expresados como la mediana  $\pm$  el rango intercuartílico. Los datos de variables cualitativas se expresaron en frecuencias relativas (%).

Se usó 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 tablas de contingencia fueron comparadas mediante la prueba  $\chi^2$ .

Se realizaron correlaciones de Pearson o Spearman en función de la normalidad de las variables. La relación entre los niveles plasmáticos de antioxidantes y hábitos nutricionales se estimó a partir de un análisis de correspondencia. El análisis univariante (ANOVA) se empleó para la determinación de las interacciones factoriales; el análisis de los parámetros psicológicos en función del tiempo fue determinado mediante un modelo lineal general para medidas repetidas; la predicción del peso de los neonatos se estimó mediante un modelo de regresión lineal.

En todos los casos se empleó una potencia estadística del 80% y se consideró un nivel de significación inferior al 0.05.

# *Resultados*

## 1. Características generales de la población

La población de estudio está integrada por 200 mujeres gestantes; el 91.5% de nacionalidad española y el resto de origen latinoamericano o de países de la Unión Europea, teniendo el 98.4% residencia en la Comunidad Autónoma de Madrid. En cuanto a los datos socioeconómicos se constató que un 56.1% tiene casa en propiedad frente al 30.7% que vivía en alquiler (hubo un 13.2% de pérdida de seguimiento). En el momento del estudio, el 65.5% de la población tenía pareja; en el 95.1% de los casos, la pareja tenía empleo y el 85.0% de las madres trabajaba. El 69.7% de las gestantes tenían estudios universitarios. En relación a los ingresos medios del núcleo familiar, en el 3.8% de la población fueron inferiores a 1000 €/mensuales, en el 22.0% estuvieron entre 1001 y 2000 €/mensuales, en el 31.4% entre 2001 y 3000 €/mensuales y en el 42.7% de los casos más de 3000 €/mensuales.

En relación a los datos sobre salud de la población de estudio, un 11.1% afirmó ser ex-fumadora, habiendo dejado de fumar tras haberse quedado embarazada; un 15.9% asumía seguir fumando durante el embarazo, consumiendo una media de entre 1 y 12 cigarrillos al día. El 40.4% de la población consumía alcohol durante la gestación, de las cuales el 92.0% lo hacía de forma esporádica y el 8.0% los fines de semana. En cuanto al consumo habitual de fármacos durante el embarazo, un 4.0% de las mujeres tomaban antidepresivos, un 8.0% tranquilizantes y un 28.0% analgésicos.

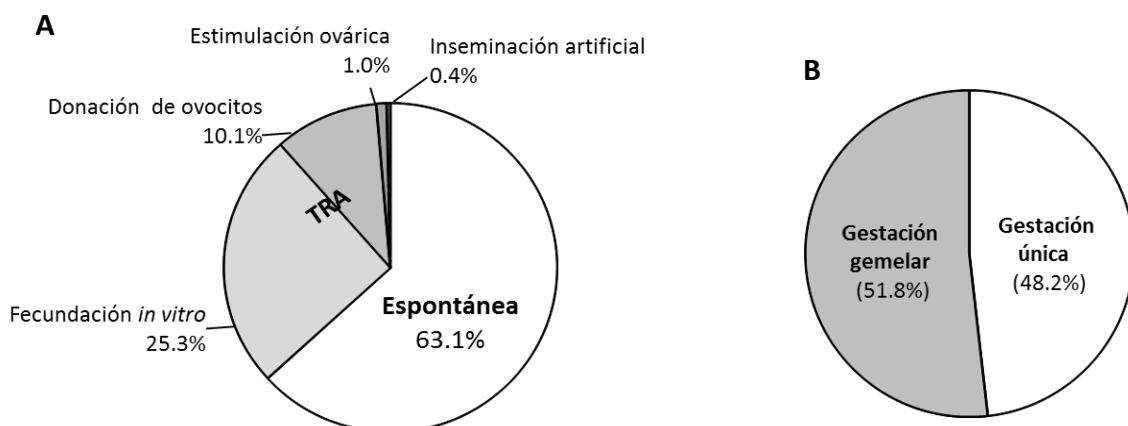
Las encuestas sobre nutrición revelaron que todas las mujeres del estudio tomaban desayuno, comida y cena. El 68.4%, además, toma una comida a media mañana y el 63.3% toma merienda. El número medio de vasos de agua al día fue de  $6.3 \pm 2.8$  y el de refrescos de  $1.3 \pm 1.3$ . El 97.2% usaba aceite de oliva en su cocina habitual. El consumo de frutas y verduras fue elevado en la población; el 65.5% afirmó consumir frutas o zumos naturales diariamente y el 34.3% de forma semanal; el 35.6% de las mujeres consumía verduras o ensaladas a diario y el 64.4% semanalmente. La mayoría de las mujeres consumen lácteos de forma diaria (77.3%) y el 22.7% restante afirmó consumirlos semanalmente. Un 88.9% de las mujeres tomaba suplementos polivitamínicos y el 99.4% tomaba ácido fólico durante la gestación.

La encuesta sobre percepción del descanso durante la noche reveló que el 34.6% de la población estaba insatisfecha. El 17.1% afirmó tener dificultades para conciliar el



sueño en más de 3 días a la semana, el 49.3% presentan somnolencia diurna más de 3 días en semana y el 40.3% se despierta 3 o más veces durante la noche, fundamentalmente por ganas de miccionar. La eficacia del sueño percibida por las embarazadas se midió como la relación horas dormidas/horas en la cama; en un 32.5% de los casos esta relación fue menor del 80%.

La ganancia media de peso durante la gestación fue de  $2.6 \pm 1.3$  kg en el primer trimestre, de  $5.8 \pm 2.6$  kg en el segundo trimestre y de  $5.8 \pm 2.8$  kg en el tercer trimestre. El 52.0% de la población había tenido un embarazo previo y el 52.0% había tenido abortos previos. El 36.9% accedió a la maternidad por medio de una técnica de reproducción asistida (TRA), siendo la fecundación *in vitro* la más frecuente, seguida de la donación de ovocitos (Figura 20A). La edad de las mujeres que accedieron a la maternidad mediante TRA fue significativamente mayor que la de aquellas que tuvieron un embarazo espontáneo (espontáneo= $33.3 \pm 0.4$ ; TRA= $36.4 \pm 0.5$ ;  $p=0.001$ ). Las madres que accedieron a la maternidad mediante TRA presentaron una media de  $3.5 \pm 2.0$  años de esterilidad previos. En la población estudiada se detecta un 48.2% de gestaciones únicas y un 51.8% de gestaciones gemelares (Figura 20B). Los embarazos TRA fueron en su mayoría embarazos gemelares (93.2%).



**Figura 20.** Distribución de la población según (A) el tipo de reproducción (espontánea o mediante técnicas de reproducción asistida, TRA) y (B) según el tipo de gestación (única o gemelar).

## 2. Complicaciones maternas y fetales

La población analizada se reclutó como población sana en el momento de incluirse en el estudio (semana 3-4 de gestación). En el 53.3% de las mujeres se diagnosticó algún tipo de complicación gestacional (tanto maternas como fetales) en etapas posteriores del embarazo.

Las complicaciones maternas se clasificaron en leves o severas. En el total de la población, se encontraron las siguientes complicaciones leves:

- Colestasis intra-hepática (1.1%)
- Dermopatías (4.4%)
- Anemia gestacional (17.0%)
- Hiperemesis gravídica (20.9%)

Por otro lado, las complicaciones severas encontradas en la población fueron:

- Hipertensión gestacional (2.2%)
- Preclamsia (4.9%)
- Diabetes gestacional (6.0%)

No se detectaron diferencias significativas en la edad media de las madres que tuvieron una gestación sin complicaciones en comparación con las que desarrollaron algún tipo de complicación materna (sin complicaciones= $34.5\pm 4.3$  años; con complicaciones= $34.5\pm 4.5$  años). Las madres que desarrollaron algún tipo de complicación materna presentaron menos semanas de gestación en comparación con las que no presentaron complicaciones ( $37.0\pm 0.3$  frente a  $37.9\pm 0.3$  semanas;  $p=0.02$ ).

En la población de estudio se encontraron un 16.8% de abortos y se detectó un 30.7% de complicaciones fetales que incluyen:

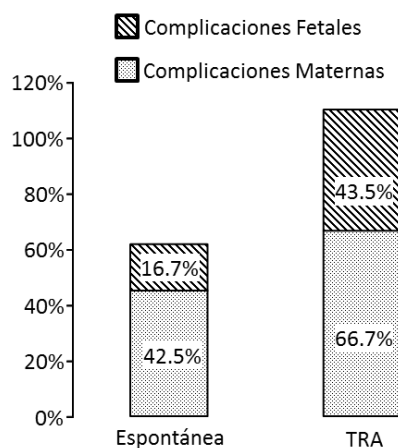
- Crecimiento intrauterino retardado (CIR, 8.8%).
- Prematuridad (25.1%).

La edad media de las mujeres que tuvieron alguna complicación fetal fue significativamente mayor que la media de edad de las gestantes que no desarrollaron complicaciones fetales (sin complicaciones =  $33.9\pm 4.4$  años; con complicaciones =  $35.7\pm 3.9$  años;  $p=0.029$ ). En cuanto a los neonatos prematuros se observó que la edad

gestacional media fue de  $34.7 \pm 2.4$  semanas de gestación. Además, la mayoría de los neonatos CIR fueron prematuros.

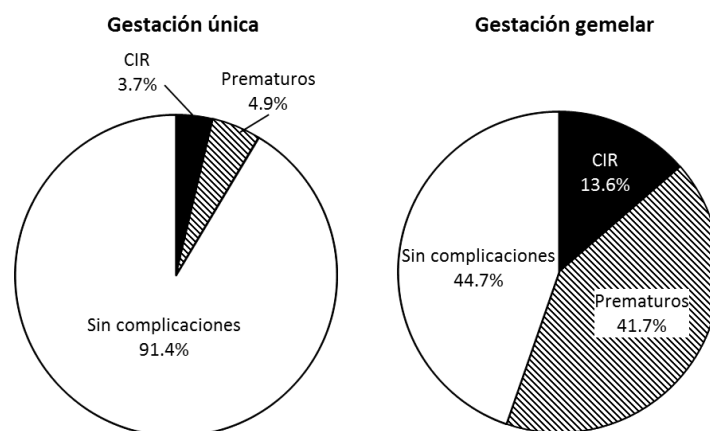
El desarrollo de complicaciones fetales se asoció con complicaciones maternas (60.0%;  $\chi^2=0.015$ ). Así, las madres que desarrollaron algún tipo de complicación materna tuvieron mayor prevalencia de partos prematuros (69.0%;  $\chi^2=0.001$ ).

Por otro lado, hubo mayor prevalencia de complicaciones tanto maternas como fetales en las gestaciones TRA en comparación con las gestaciones espontáneas (Figura 21). No se detectaron diferencias significativas entre la interacción del tipo de reproducción (espontánea o TRA) y la edad de la madre con el desarrollo de complicaciones maternas o fetales.



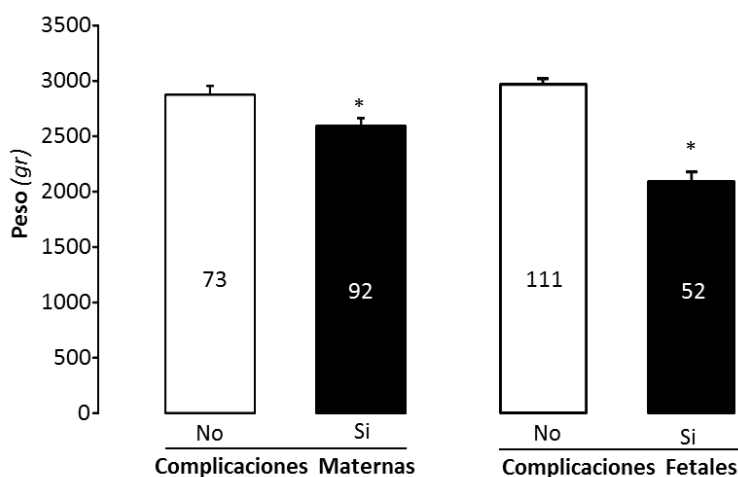
**Figura 21.** Distribución de complicaciones maternas o fetales en función del tipo de reproducción. TRA, Técnicas de Reproducción Asistida.

Las gestaciones gemelares tuvieron porcentajes mayores de complicaciones fetales, tanto de CIR como de prematuridad, que las gestaciones únicas (Figura 22).



**Figura 22.** Complicaciones fetales en función del tipo de gestación. CIR, Crecimiento Intrauterino Retardado.

Las mujeres que desarrollaron complicaciones maternas o fetales tuvieron neonatos de menor peso en comparación a las madres con gestaciones normales (Figura 23). Los neonatos de muy bajo peso (<1500 gr) fueron más prevalentes en los embarazos con complicaciones maternas o fetales (Tabla 4). Se encontró una correlación negativa entre el peso de los recién nacidos y la edad materna ( $r=-0.165$ ;  $p=0.035$ ).



**Figura 23.** Pesos de los recién nacidos en función de las complicaciones maternas o fetales.  $*p<0.05$ ; prueba T de Student.

**Tabla 4.** Peso del recién nacido en función de las complicaciones maternas y fetales.

		Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
		No	Sí	No	Si
<b>Peso del neonato</b>	Normopeso , 71.2%	50.0% (59)	50.0% (59)	87.8% (101)	12.2% (14)
	Bajo peso, 22.9%	27.8% (10)	72.2% (26)	27.0% (10)	73.0% (27)
	Muy bajo peso, 5.9%	30.0% (3)	70.0% (7)*	0% (0)	100% (10)*

Entre paréntesis se expresa el número de casos.  $*p<0.05$ ; prueba  $\chi^2$ .

### 2.1. Complicaciones maternas y fetales en función de las características sociales

No se encontraron diferencias significativas en cuanto al desarrollo o no de complicaciones maternas o fetales con ninguno de los parámetros sociodemográficos estudiados (Tabla 5).

**Tabla 5.** Complicaciones maternas y fetales en función de las características sociales.

		Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
		No	Sí	No	Si
<b>Estado civil</b>	Con pareja, 65.5%	47.5% (58)	52.5% (64)	74.3% (84)	25.7% (29)
	Sin pareja, 34.5%	45.0% (27)	55.0% (33)	71.9% (41)	28.1% (16)
<b>Estudios</b>	No Universitarios, 30.3%	35.3% (18)	64.7% (33)	74.5% (35)	25.5% (12)
	Universitarios, 69.7%	51.2% (63)	48.8% (60)	74.8% (86)	25.2% (29)
<b>Empleo de la pareja</b>	Trabajando, 95.1%	46.0% (75)	54.0% (88)	75.5% (114)	24.5% (37)
	En paro, 4.9%	75.0% (6)	25.0% (2)	75.0% (6)	25.0% (2)
<b>Empleo</b>	Trabajando, 85.0%	48.4% (76)	51.6% (81)	76.0% (111)	24.0% (35)
	En paro, 15.0%	36.0% (9)	64.0% (16)	58.3% (14)	41.7% (10)
<b>Ingresos del núcleo familiar €/mes</b>	< 1000, 3.8%	40.0% (2)	60.0% (3)	40.0% (2)	60.0% (3)
	1001 - 2000, 22.2%	27.5% (11)	72.5% (29)	76.3% (29)	23.7% (9)
	2001 - 3000, 31.4%	52.7% (29)	47.3% (26)	77.1% (37)	22.9% (11)
	> 3000, 42.7%	52.1% (37)	47.9% (34)	75.0% (51)	25.0% (17)

Entre paréntesis se expresa el número de casos.

### 2.2. Complicaciones maternas y fetales en función del estilo de vida

No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la aparición de complicaciones maternas o fetales en relación con el consumo de tabaco, alcohol o fármacos (Tabla 6).

**Tabla 6.** Complicaciones maternas y fetales en función de los estilos de vida.

		Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
		No	Sí	No	Si
<b>Tabaco</b>	No fumadora, 73.0%	48.0% (60)	52.0% (65)	73.7% (87)	26.3% (31)
	Fumadora, 27.0%	42.9% (21)	57.1% (28)	77.3% (34)	22.7% (10)
<b>Alcohol</b>	No consume, 59.6%	45.6% (47)	54.4% (56)	77.9% (74)	22.1% (21)
	Si consume, 40.4%	48.6% (34)	51.4% (36)	69.7% (46)	30.3% (20)
<b>Fármacos habituales</b>	No, 75.8%	48.4% (61)	51.6% (65)	77.6% (90)	22.4% (26)
	Si, 24.2%	42.9% (18)	57.1% (24)	67.5% (27)	32.5% (13)

Entre paréntesis se expresa el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba  $\chi^2$ .

### 2.3. Complicaciones maternas y fetales en función de los hábitos nutricionales

No se encontró asociación entre la aparición de complicaciones maternas o fetales con diferencias en el consumo de frutas o zumos naturales, verduras o ensaladas ni de lácteos (Tabla 7).

**Tabla 7.** Complicaciones maternas y fetales en función de los hábitos nutricionales.

		Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
		No	Sí	No	Si
<b>Frutas o zumos naturales</b>	1-2/semana, 6.8%	41.7% (5)	58.3% (7)	75.0% (9)	25.0% (3)
	3-6/semana, 27.1%	45.7% (21)	54.3% (25)	88.4% (38)	11.6% (5)
	1-2/día, 65.5%	47.1% (49)	52.9% (55)	70.5% (67)	29.5% (28)
<b>Verduras o ensaladas</b>	1-2/semana, 14.1%	33.3% (8)	66.7% (16)	69.6% (16)	30.4% (7)
	3-6/semana, 50.3%	50.0% (44)	50.0% (44)	75.3% (61)	24.7% (20)
	1-2/día, 35.6%	47.1% (24)	52.9% (27)	78.7% (37)	21.3% (10)
<b>Lácteos</b>	1-2/semana, 4.0%	28.6% (2)	71.4% (5)	71.4% (5)	28.6% (2)
	3-6/semana, 18.2%	38.7% (12)	61.3% (19)	82.1% (23)	17.9% (5)
	1-2/día, 77.3%	48.8% (60)	51.2% (63)	74.6% (85)	25.4% (29)

Entre paréntesis se expresa el número de casos.

### 3. Parámetros biológicos

En el presente estudio se analizaron cuatro grupos de parámetros biológicos:

- Parámetros bioquímicos y hematológicos de rutina en clínica.
- Biomarcadores del estado oxidativo en plasma, incluyendo antioxidantes y daño oxidativo a macromoléculas.
- Hormonas (melatonina y cortisol).
- Citoquinas.

Todos ellos se evaluaron en la semana 9 de gestación, antes de la aparición de complicaciones maternas o fetales.

En el apartado 3.1. estos parámetros se analizan como potenciales biomarcadores tempranos del desarrollo de una complicación materna o fetal. En el apartado 3.2. se describen las alteraciones de estos parámetros en función del tipo de gestación (única o gemelar) y la influencia del uso de TRA.

#### *3.1. Parámetros biológicos en función de las complicaciones maternas y fetales*

Parte de los resultados de este apartado han sido publicados en Ramiro-Cortijo *et al.*, "*Maternal plasma antioxidant status in the first trimester of pregnancy and development of obstetric complications*" *Placenta*. 2016; 47:37-45, que se recoge en los anexos.

##### 3.1.1. Parámetros bioquímicos y hematológicos

En la tabla 8 se presentan los valores de los parámetros bioquímicos en función de la presencia o no de complicaciones maternas o fetales.

Todos los parámetros analizados estaban en el rango normal, con excepción de los triglicéridos y el ácido úrico, que fueron significativamente mayores en las embarazadas que desarrollaron complicaciones maternas en comparación con aquellas que no las desarrollaron. No se encontraron diferencias significativas en el resto de los parámetros analizados.

Asimismo, los niveles de triglicéridos fueron significativamente más altos en mujeres que desarrollaron complicaciones fetales en comparación con aquellas que no las desarrollaron.

**Tabla 8.** Parámetros bioquímicos en función de complicaciones maternas o fetales.

	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
	No	Si	No	Si
<b>Glucosa</b> (mg/dl) <i>68-93 mg/dl</i>	96.5±3.7 (83)	91.7±3.0 (93)	93.9±2.9 (118)	97.2±4.6 (53)
<b>Colesterol</b> (mg/dl) <i>140-220 mg/dl</i>	171.6±3.1 (83)	177.2±3.0 (93)	174.1±2.5 (118)	179.1±4.4 (53)
<b>Triglicéridos</b> (mg/dl) <i>&lt;100 mg/dl</i>	83.9±3.4 (82)	96.9±3.6* (93)	85.3±3.0 (117)	107.2±4.8* (53)
<b>ALA-T</b> (UI/L) <i>4-30 UI/L</i>	17.0±1.1 (69)	16.7±0.8 (65)	16.7±0.7 (92)	19.0±2.1 (37)
<b>Bilirrubina total</b> (mg/dl) <i>0.2-1.0 mg/dl</i>	0.6±0.02 (71)	0.5±0.03 (65)	0.5±0.02 (93)	0.5±0.04 (38)
<b>Ácido úrico</b> (mg/dl) <i>2.0-3.0 mg/dl</i>	2.8±0.1 (70)	3.2±0.1* (66)	2.9±0.1 (93)	3.2±0.1 (38)
<b>TSH</b> (mUI/L) <i>0.8-2.0 mUI/L</i>	1.9±0.3 (72)	1.7±0.2 (81)	1.9±0.2 (102)	1.7±0.3 (46)

ALA-T, Alanina-Transferasa; TSH, Hormona estimulante del tiroides. En la columna de la izquierda, en cursiva, se indican los rangos normales en embarazadas. Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos. \* $p<0.05$ ; prueba T de Student.

En cuanto a los parámetros hematológicos, todos estuvieron en el rango de normalidad, no encontrándose diferencias significativas en ninguno de ellos en función del desarrollo de complicaciones maternas (Tabla 9).

Los niveles de hematocrito fueron significativamente menores y los niveles de leucocitos fueron significativamente mayores en los embarazos con complicaciones fetales en comparación con los embarazos sin complicaciones fetales (Tabla 9).



**Tabla 9.** Parámetros hematológicos en función de las complicaciones maternas o fetales.

	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
	No	Si	No	Si
<b>Hemoglobina (g/dl)</b> <i>≥ 11 g/dl</i>	16.5±0.7 (75)	16.6±0.7 (72)	17.0±0.6 (98)	15.7±0.9 (44)
<b>Hematíes (10<sup>6</sup>/ml)</b> <i>≥ 3.5 10<sup>6</sup>/ml</i>	4.3±0.04 (75)	4.3±0.05 (72)	4.3±0.04 (98)	4.2±0.06 (44)
<b>Hematocrito (%)</b> <i>≥ 33 %</i>	39.3±0.3 (75)	38.9±0.3 (72)	39.5±0.3 (98)	38.3±0.5* (44)
<b>Leucocitos (10<sup>6</sup>/ml)</b> <i>5-10 10<sup>6</sup>/ml</i>	7.9±0.2 (75)	8.4±0.2 (72)	7.8±0.2 (98)	8.8±0.3* (44)
<b>Plaquetas (10<sup>3</sup>/ml)</b> <i>≥ 240 10<sup>3</sup>/ml</i>	251.3±6.5 (75)	249.3±6.6 (72)	249.6±5.7 (98)	253.5±8.6 (44)

En la columna de la izquierda, en cursiva, se indican los rangos normales en embarazadas. Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba T de Student.

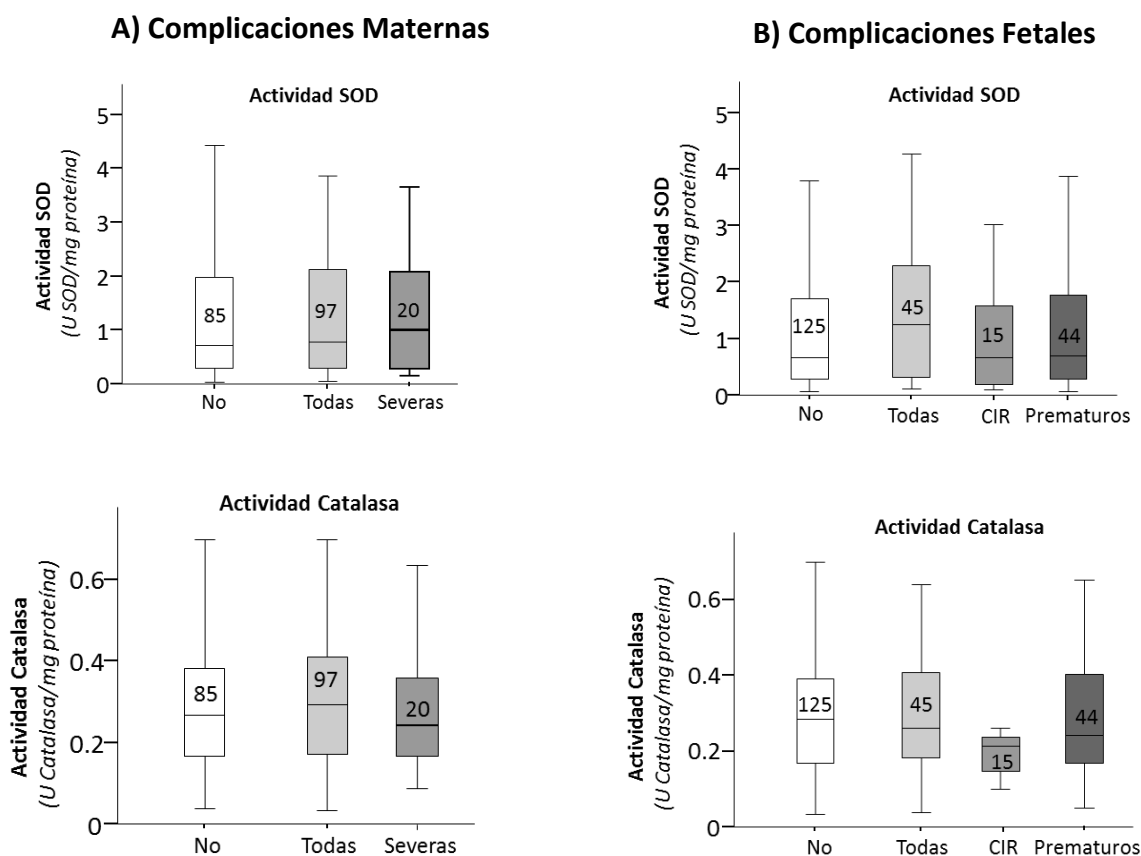
Se detectó una correlación negativa entre los niveles de leucocitos en sangre y el peso de los neonatos ( $r = -0.304$ ;  $p = 0.001$ ).

## 3.1.2. Biomarcadores del estado oxidativo plasmático

## 3.1.2.1. Antioxidantes

**Antioxidantes enzimáticos.** No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ni en la actividad SOD (medida mediante el método *SOSA*) ni en la actividad catalasa, entre los embarazos que presentaron algún tipo de complicación materna frente a los que no presentaron complicaciones (Figura 24A).

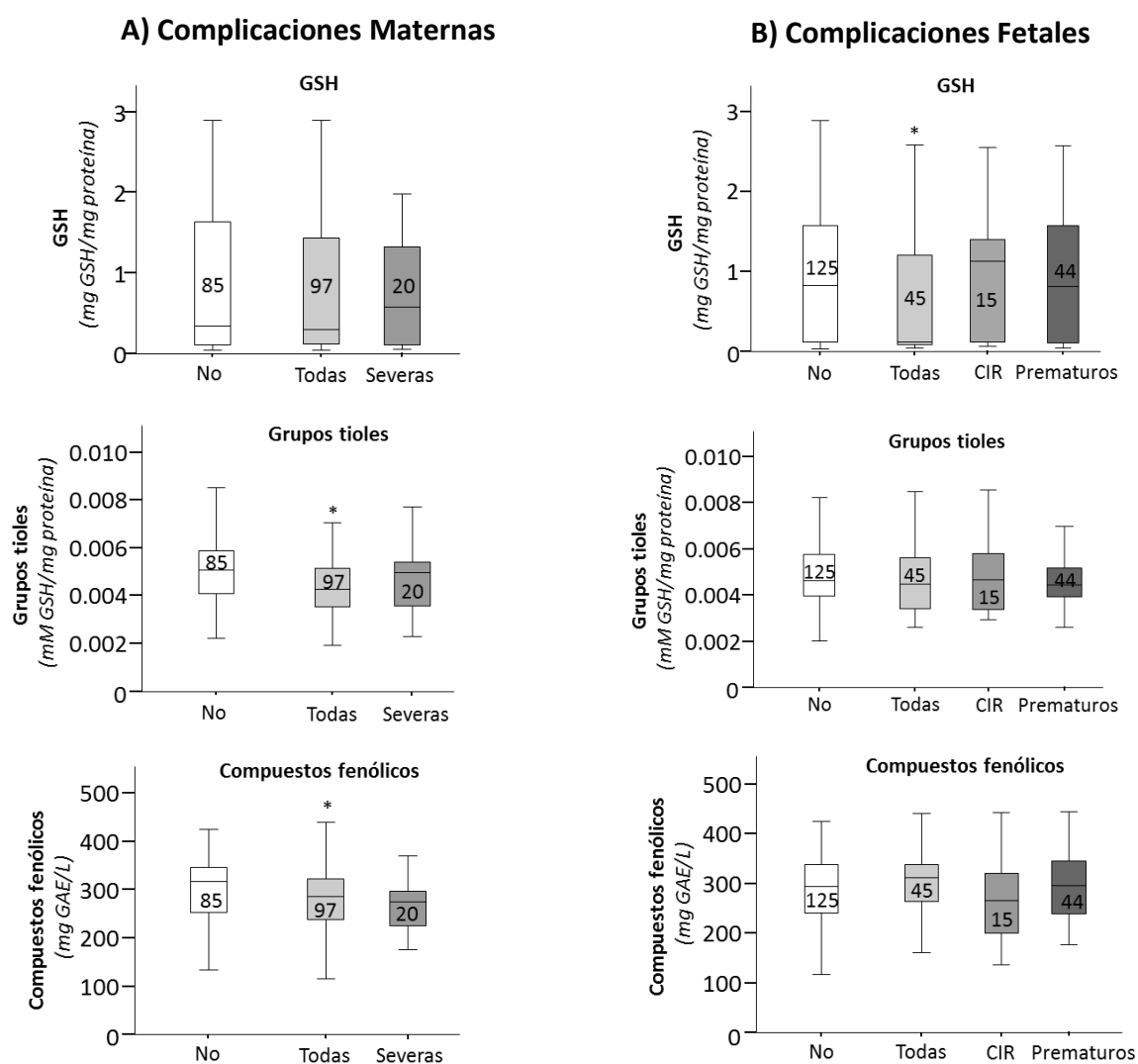
Tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas en estos parámetros al comparar los embarazos que desarrollaron complicaciones fetales con los que no las desarrollaron (Figura 24B).



**Figura 24.** Actividades SOD y Catalasa en función de las complicaciones maternas (A) y complicaciones fetales (B). Los datos representan la mediana  $\pm$  rango intercuartílico. Dentro de la barra se indica el número de casos. *CIR*, *Crecimiento Intrauterino Retardado*; *SOD*, *Superóxido Dismutasa*; *SOSA*, *Actividad de Captación de Anión Superóxido*.

**Antioxidantes de bajo peso molecular.** No se detectaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de glutation reducido (GSH) entre embarazos con o sin complicaciones maternas. Las concentraciones plasmáticas de grupos tioles y de compuestos fenólicos fueron significativamente menores en los embarazos que desarrollaron complicaciones maternas en comparación con las gestaciones que no las desarrollaron (Figura 25A).

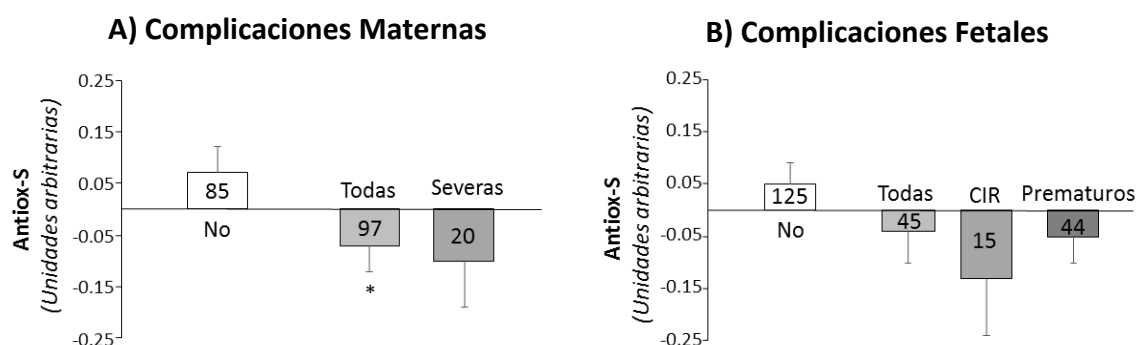
Los niveles de GSH en plasma fueron significativamente menores en los embarazos que desarrollaron complicaciones fetales en comparación con los que no las desarrollaron. No se detectaron diferencias en las concentraciones de grupos tioles ni de compuestos fenólicos entre embarazos con o sin complicaciones fetales (Figura 25B).



**Figura 25.** Nivel de glutation (GSH), tioles y de fenoles en función de las complicaciones maternas (A) o fetales (B). Los datos representan la mediana±rango intercuartílico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba U de Mann-Whitney.

**Estado antioxidante global en plasma.** Se calculó un índice del estado antioxidante global (Antiox-S) en plasma, teniendo en cuenta todos los antioxidantes evaluados, tanto enzimáticos como de bajo peso molecular. El valor del parámetro Antiox-S fue positivo en el grupo de mujeres con gestaciones normales mientras que fue negativo (por debajo de la media de la población) en los embarazos que desarrollaron complicaciones maternas, siendo la diferencia estadísticamente significativa. En embarazos con complicaciones maternas severas el Antiox-S alcanzó valores más negativos aunque no se detectó diferencias estadísticas, posiblemente debido al tamaño muestral (Figura 26A).

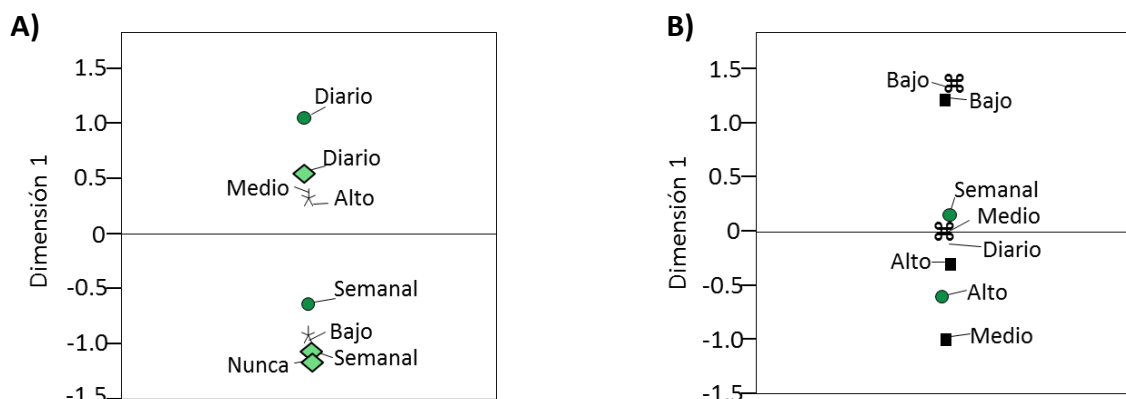
El valor Antiox-S también fue negativo en mujeres que tuvieron complicaciones fetales, tanto considerándolas en su conjunto como de manera separada por CIR y prematuridad, aunque no se alcanzó el nivel de significancia estadística (Figura 26B).



**Figura 26.** Capacidad antioxidante total (Antiox-S) en plasma, en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B). Los datos representan la media±error típico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba T de Student.

**Relación entre los niveles plasmáticos de antioxidantes y hábitos nutricionales.** La relación entre la dieta y los antioxidantes plasmáticos se determinó mediante un análisis múltiple de correspondencia. Se encontró que un consumo diario de frutas y verduras se relacionó con altos niveles de compuestos fenólicos en plasma, mientras que un consumo menor (semanal) se agrupó con niveles bajos de compuestos fenólicos ( $\alpha$  de Cronbach=0.434; Figura 27A). De forma similar, un consumo elevado de verduras (diario) se agrupó con altos niveles de Antiox-S e IL-10; el consumo semanal de verduras se asoció con menores niveles de Antiox-S e IL-10 ( $\alpha$  de Cronbach=0.303; Figura 27B).

**Análisis de correspondencia entre el consumo de frutas y verduras, el estado antioxidante global e IL-10 en plasma**

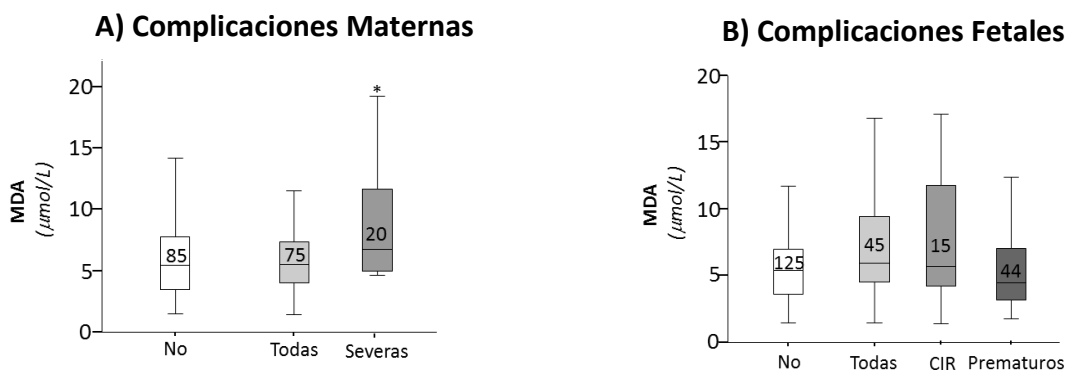


**Figura 27.** Relación entre el consumo de frutas (◆) y verduras (●) y los niveles de compuestos fenólicos en plasma (☆) (A). Relación entre el consumo de verduras (●), estado antioxidante global del plasma (Antiox-S; ■) e IL-10 en plasma (⌘) (B). El consumo fue categorizado como: diario (1-2 veces/día); semanal (1-6 veces/semana); nunca. El nivel de parámetros plasmáticos (fenoles, Antiox-S e IL-10) fue categorizado en: bajo (cuartil 1); medio (cuartil 2); alto (cuartil 3). *IL*, Interleuquina.

3.1.2.2. Biomarcadores de daño oxidativo

**Daño oxidativo a lípidos.** No se detectaron diferencias estadísticas en los niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) entre los embarazos con o sin complicaciones maternas. Sin embargo los niveles de MDA fueron significativamente mayores en los embarazos que desarrollaron complicaciones maternas severas en comparación con aquellas gestaciones que no desarrollaron este tipo de complicaciones (Figura 28A).

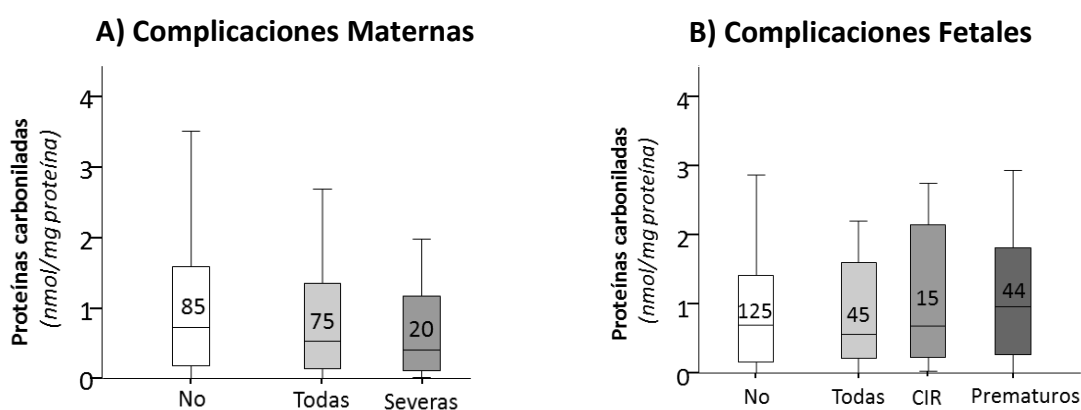
No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de MDA entre los embarazos con o sin complicaciones fetales (Figura 28B).



**Figura 28.** Niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA) en función de las complicaciones maternas (A) o fetales (B). Los datos representan la mediana±rango intercuartílico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba U de Mann-Whitney.

**Daño oxidativo a proteínas.** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos de proteínas carboniladas entre las mujeres que desarrollaron complicaciones maternas en comparación con las que no las desarrollaron (Figura 29A).

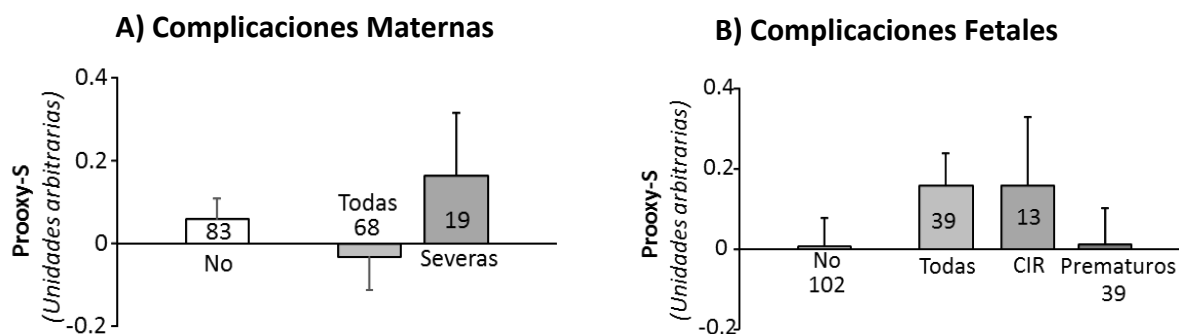
Tampoco se detectaron diferencias en los niveles plasmáticos de carbonilos entre los embarazos que desarrollaron complicaciones fetales con respecto a los que no las desarrollaron (Figura 29B).



**Figura 29.** Niveles de proteínas carboniladas en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B). Los datos representan la mediana±rango intercuartílico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba U de Mann-Whitney.

**Daño oxidativo plasmático global.** Se calculó un índice representativo del estado prooxidativo plasmático (Prooxy-S), teniendo en cuenta las determinaciones de los biomarcadores de oxidación de lípidos y proteínas. No se detectaron diferencias significativas en el Prooxy-S entre embarazos con o sin complicaciones maternas, aunque se detectaron mayores niveles en embarazos con complicaciones severas, sin alcanzarse la significancia estadística (Figura 30A).

También se observaron mayores valores de Prooxy-S en embarazos con complicaciones fetales en comparación con aquellos que no las presentaron, aunque no se alcanzó la significancia estadística (Figura 30B).

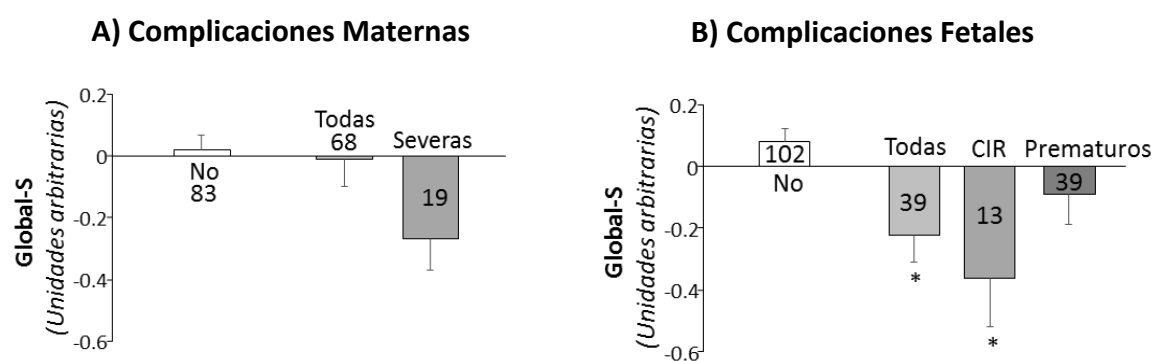


**Figura 30.** Daño oxidativo global (Prooxy-S) en plasma en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B). Los datos representan la media±error típico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba T de Student.

**Balance oxidativo plasmático global.** El índice de estado oxidativo plasmático global (Global-S) se determinó como la diferencia entre el Antiox-S y el Prooxy-S.

En mujeres con embarazo sin complicaciones el Global-S fue positivo, mientras que fue negativo en aquellas que desarrollaron complicaciones maternas, particularmente en mujeres con complicaciones severas, aunque no se alcanzó la significancia estadística (Figura 31A).

En gestaciones que desarrollaron complicaciones fetales, el Global-S también fue negativo particularmente aquellas que desarrollaron CIR, siendo la diferencia estadísticamente significativa en comparación con los que no los desarrollaron (Figura 31B).

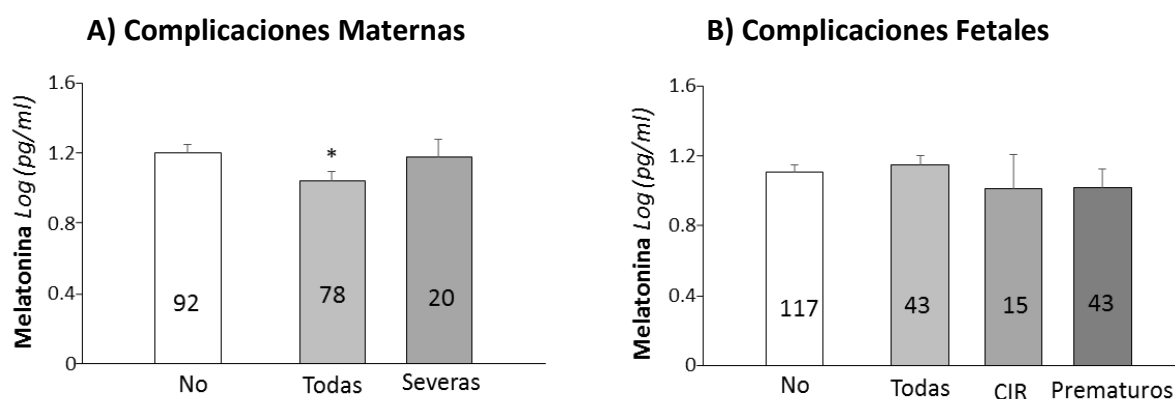


**Figura 31.** Puntuaciones del balance oxidativo global (Global-S) en plasma, en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B). Los datos representan la media±error típico. Los datos indican el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba T de Student.

## 3.1.3. Hormonas

**Melatonina.** Los niveles diurnos de melatonina en plasma fueron significativamente menores en los embarazos que desarrollaron complicaciones maternas en relación con los que no las desarrollaron (Figura 32A). Cuando se consideraron las complicaciones maternas severas no se detectaron diferencias significativas en comparación con las madres que no presentaron complicaciones maternas.

No se detectaron diferencias en los niveles diurnos de melatonina plasmática en las gestaciones que desarrollaron complicaciones fetales tanto consideradas en su conjunto como de manera separada CIR y prematuridad en comparación con las que no las desarrollaron (Figura 32B).

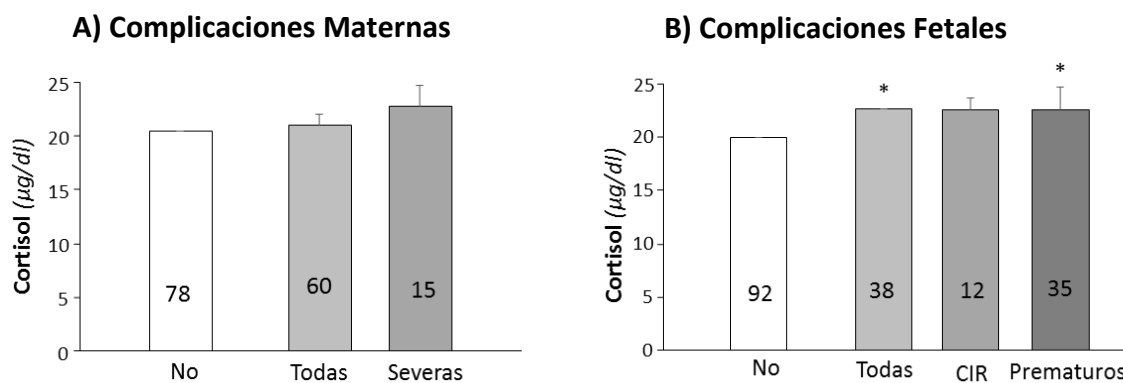


**Figura 32.** Niveles diurnos de melatonina plasmática en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B). Los datos representan la media±error típico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba T de Student.

**Cortisol.** Los niveles plasmáticos de cortisol no presentaron diferencias significativas entre embarazos con o sin complicaciones maternas. Los niveles tendieron a ser más altos en mujeres que desarrollaron complicaciones maternas severas, aunque no se alcanzó la significancia estadística (Figura 33A).

Los niveles plasmáticos de cortisol fueron significativamente mayores en los embarazos que desarrollaron complicaciones fetales en comparación con los que no las desarrollaron. También se observaron mayores niveles de cortisol en las madres que tuvieron partos prematuros en comparación con las que tuvieron partos a término (Figura 33B), mientras que no se detectaron diferencias significativas en los embarazos que desarrollaron CIR.



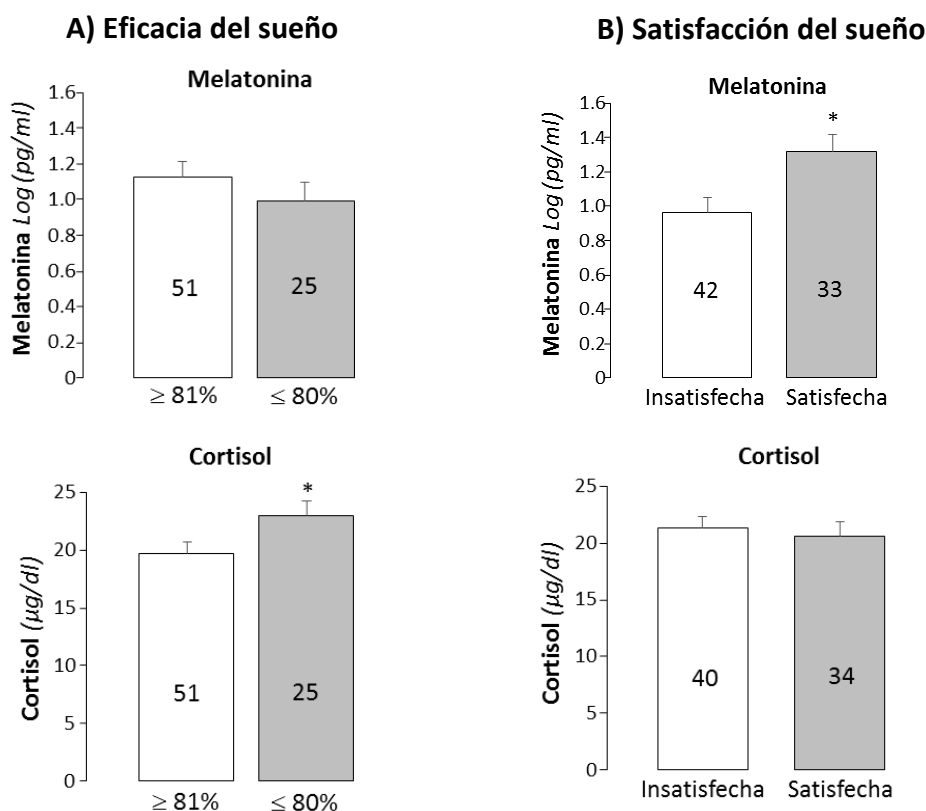


**Figura 33.** Niveles plasmáticos de cortisol en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B). Los datos representan la media±error típico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p<0.05$ ; prueba T de Student.

Se encontró una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de cortisol materno y el peso del recién nacido ( $r=-0.326$ ;  $p=0.006$ ). También se encontró una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de cortisol y la concentración de leucocitos en sangre ( $r=0.191$ ;  $p=0.032$ ). Así mismo, se encontró una correlación positiva entre los niveles plasmáticos de cortisol y la edad de la madre ( $r=0.225$ ;  $p=0.008$ ).

**Relación entre melatonina, cortisol y sueño.** No se encontraron cambios significativos en los niveles diurnos de melatonina en plasma en función de la eficacia del sueño (horas de sueño/horas en la cama). Sin embargo, los niveles de cortisol fueron mayores en mujeres con eficacia del sueño  $\leq 80\%$  (Figura 34A).

Los niveles diurnos de melatonina plasmática fueron significativamente mayores en aquellas mujeres que afirmaron estar satisfechas con su sueño, mientras que no se detectaron diferencias en los niveles de cortisol en función de la satisfacción del sueño (Figura 34B).



**Figura 34.** Niveles plasmáticos de melatonina y cortisol en función de la eficacia del sueño (A) o de la satisfacción del sueño (B). Los datos representan la media±error típico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba T de Student.

### 3.1.4. Citoquinas

No se detectaron diferencias significativas en los niveles de IL-1 $\beta$ , MCP-1 y TNF- $\alpha$  al comparar los embarazos que desarrollaron complicaciones maternas o fetales con respecto a los que no las desarrollaron (Tabla 10).

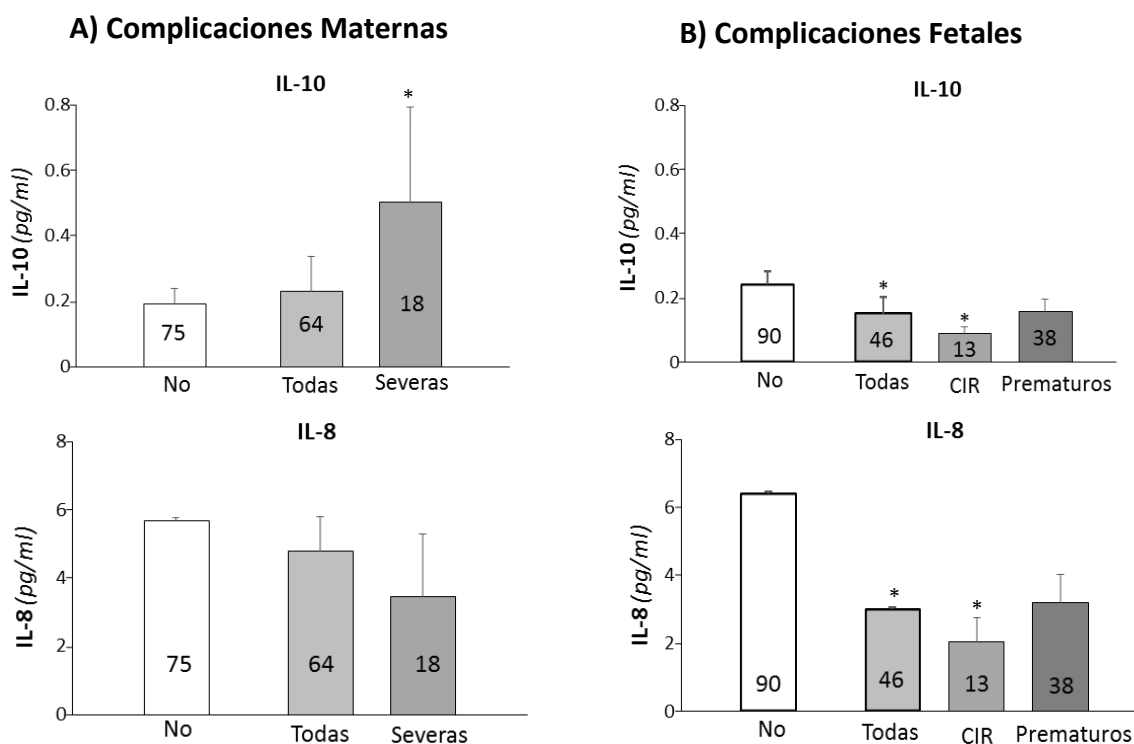
**Tabla 10.** Niveles de citoquinas plasmáticas en función del desarrollo de complicaciones maternas o fetales.

	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
	No	Si	No	Si
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	5.6±1.3 (65)	7.3±2.3 (74)	7.6±2.0 (90)	4.2±0.9 (46)
MCP-1 (pg/ml)	131.0±9.7 (65)	140.1±8.1 (97)	132.1±6.9 (90)	141.8±13.98 (46)
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	0.3±0.1 (65)	1.5±0.8 (74)	0.6±0.3 (90)	0.8±0.4 (46)

IL, Interlequina; MCP, Proteína quimiotáctica de Monocitos; TNF, Factor de Necrosis Tumoral. Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

Los niveles de IL-10 fueron significativamente mayores en embarazadas que desarrollaron complicaciones maternas severas en comparación con los embarazos normales. Al analizar por separado la DMG y la PE se encontró que esta diferencia sólo fue significativa para los embarazos que desarrollaron DMG (sin complicaciones=0.2±0.01 pg/ml; DMG=0.8±0.6 pg/ml; p=0.001). No se detectaron diferencias en los niveles de IL-8, aunque tendieron a ser inferiores en embarazos con complicaciones severas, sin alcanzarse la significancia estadística (Figura 35A). Analizando separadamente los embarazos con DMG y PE se encontró que los niveles de IL-8 fueron significativamente más bajos sólo en mujeres que desarrollaron PE (sin complicaciones=5.5±0.9 pg/ml; PE=1.5±0.8 pg/ml; p=0.003).

Tanto los niveles de IL-10 como los de IL-8 fueron significativamente menores en embarazadas que desarrollaron complicaciones fetales en comparación con las que tuvieron embarazos normales y menores en los embarazos que desarrollaron CIR en relación a los que no los desarrollaron (Figura 35B).



**Figura 35.** Niveles plasmáticos de IL-10 e IL-8 en función del desarrollo de complicaciones maternas (A) o fetales (B). Los datos representan la media±error típico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba T de Student.

### 3.2. Parámetros biológicos en función del tipo de gestación y tipo de reproducción

#### 3.2.1. Parámetros bioquímicos y hematológicos

En las gestaciones gemelares los niveles de colesterol, triglicéridos y Alanina-Transferasa fueron significativamente mayores en comparación con las gestaciones únicas, sin encontrar diferencias significativas en el resto de los parámetros analizados (Tabla 11).

Los embarazos con TRA presentaron niveles de triglicéridos y Alanina-Transferasa significativamente mayores que en los embarazos espontáneos. Por el contrario, los niveles de bilirrubina fueron menores en comparación con los embarazos espontáneos (Tabla 11).

**Tabla 11.** Parámetros bioquímicos en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción.

	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
<b>Glucosa</b> (mg/dl) <i>68-93 mg/dl</i>	95.1±3.4 (92)	92.1±3.1 (96)	95.0±2.9 (119)	92.6±3.7 (70)
<b>Colesterol</b> (mg/dl) <i>140-220 mg/dl</i>	167.7±2.5 (92)	180.9±3.1* (96)	172.8±2.5 (119)	176.9±3.4 (70)
<b>Triglicéridos</b> (mg/dl) <i>&lt;100 mg/dl</i>	78.0±3.1 (92)	105.4±3.7* (95)	82.8±2.9 (119)	107.1±4.6* (69)
<b>ALA-T</b> (UI/L) <i>4-30 UI/L</i>	14.8±0.6 (75)	20.0±1.3* (68)	15.6±0.8 (87)	19.7±1.4* (57)
<b>Bilirrubina total</b> (mg/dl) <i>0.2-1.0 mg/dl</i>	0.53±0.02 (76)	0.49±0.02 (69)	0.54±0.02 (88)	0.47±0.02* (58)
<b>Ácido úrico</b> (mg/dl) <i>2.0-3.0 mg/dl</i>	3.0±0.1 (75)	3.1±0.1 (70)	3.0±0.1 (88)	3.1±0.1 (58)
<b>TSH</b> (mUI/L) <i>0.8-2.0 mUI/L</i>	1.9±0.2 (79)	1.7±0.2 (84)	1.7±0.2 (101)	1.8±0.3 (63)

ALA-T, Alanina-Transferasa; TSH, Hormona estimulante del tiroides. En la columna de la izquierda, en cursiva, se indican los rangos normales en embarazadas. Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba T de Student.

En cuanto a los parámetros hematológicos, todos estuvieron en el rango de normalidad, observándose que en las gestaciones gemelares el nivel de leucocitos fue significativamente mayor en comparación con las gestaciones únicas; por el contrario los niveles de hematíes y hematocrito fueron significativamente menores (Tabla 12).

En los embarazos con TRA los niveles de leucocitos y plaquetas fueron significativamente mayores en comparación con las gestaciones espontáneas (Tabla 12).

**Tabla 12.** Parámetros hematológicos en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción.

	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
<b>Hemoglobina (g/dl)</b> <i>≥ 11 g/dl</i>	16.9±0.7 (79)	16.2±0.7 (77)	17.0±0.6 (97)	15.9±0.7 (60)
<b>Hematíes (10<sup>6</sup>/ml)</b> <i>≥ 3.5 10<sup>6</sup>/ml</i>	4.4±0.04 (79)	4.2±0.04* (77)	4.3±0.03 (97)	4.3±0.1 (60)
<b>Hematocrito (%)</b> <i>≥ 33 %</i>	39.7±0.3 (79)	38.6±0.3* (77)	39.2±0.3 (97)	39.1±0.4 (60)
<b>Leucocitos (10<sup>6</sup>/ml)</b> <i>5-10 10<sup>6</sup>/ml</i>	7.5±0.2 (79)	8.7±0.2* (77)	7.7±0.2 (97)	8.8±0.3* (60)
<b>Plaquetas (10<sup>3</sup>/ml)</b> <i>≥ 240 10<sup>3</sup>/ml</i>	243.7±6.8 (79)	260.0±5.7 (77)	244.6±5.8 (97)	263.3±6.6* (60)

En la columna de la izquierda, en cursiva, se indican los rangos normales en embarazadas. Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba *T de Student*.

## 3.2.2. Biomarcadores del estado oxidativo plasmático

## 3.2.2.1. Antioxidantes

**Antioxidantes enzimáticos.** No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ni en la actividad SOD ni en la actividad catalasa entre las gestaciones únicas comparadas con las gemelares (Tabla 13).

Tampoco se detectaron diferencias significativas en ninguna de las actividades enzimáticas estudiadas entre los embarazos espontáneos comparados con los TRA (Tabla 13).

**Tabla 13.** Antioxidantes enzimáticos en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción.

	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
<b>Actividad SOD</b> (U SOD/mg proteína)	0.7±4.7 (95)	0.8±4.4 (102)	0.7±4.7 (125)	0.8±4.4 (73)
<b>Actividad Catalasa</b> (U Catalasa/mg proteína)	0.3±3.1 (95)	0.3±2.6 (102)	0.3±3.1 (125)	0.3±1.5 (73)

*SOD, Superóxido Dismutasa; TRA, Técnicas de Reproducción Asistida.* Los datos representan la mediana±rango intercuartílico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

**Antioxidantes de bajo peso molecular.** No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles plasmáticos de glutatión reducido (GSH), grupos tioles ni en compuestos fenólicos entre gestaciones únicas y gemelares (Tabla 14).

Tampoco se detectaron diferencias en ninguno de estos antioxidantes al comparar las gestaciones espontáneas con las de TRA (Tabla 14).

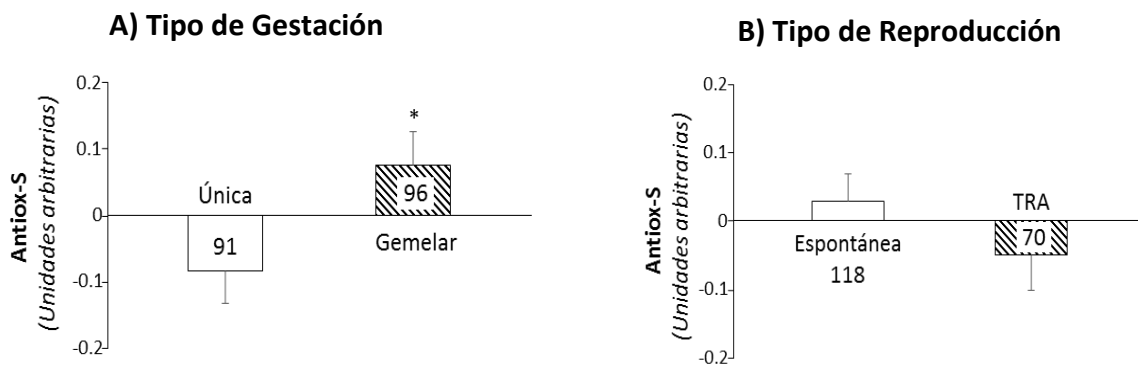
**Tabla 14.** Antioxidantes de bajo peso molecular en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción.

	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
<b>GSH</b> (mg GSH/mg proteína)	1.0±4.5 (91)	0.3±3.4 (96)	1.0±4.5 (118)	0.3±3.4 (70)
<b>Grupos tioles</b> (mM GSH/mg proteína)	0.005±0.02 (91)	0.005±0.01 (96)	0.005±0.02 (118)	0.004±0.01 (70)
<b>Compuestos fenólicos</b> (mg GAE/L)	290.0±301.1 (91)	293.0±305.3 (96)	293.1±307.9 (118)	293.0±278.3 (70)

*GSH, Glutatión reducido; TRA, Técnicas de Reproducción Asistida.* Los datos representan la mediana±rango intercuartílico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

**Estado antioxidante global en plasma.** El score del estado antioxidante global (Antiox-S) fue negativo en las gestaciones únicas mientras que las gemelares tuvo un valor positivo siendo la diferencia estadísticamente significativa (Figura 36A).

En los embarazos espontáneos el Antiox-S fue positivo mientras que fue negativo en los embarazos con TRA; la diferencia no fue significativa (Figura 36B).



**Figura 36.** Capacidad antioxidante total (Antiox-S) en plasma, en función del tipo de gestación (A) o del tipo de reproducción (B). Los datos representan la media ± error típico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p < 0.05$ ; prueba T de Student.

En la población de gestaciones gemelares, los niveles de Antiox-S fueron positivo en aquellas mujeres que no desarrollaron complicaciones fetales ( $0.12 \pm 0.06$  unidades arbitrarias;  $n=44$ ), mientras que fueron negativos en las que desarrollaron algún tipo de complicación fetal ( $-0.04 \pm 0.07$  unidades arbitrarias;  $n=30$ ) sin alcanzar la significancia estadística ( $p=0.08$ ).

## 3.2.2.2. Biomarcadores de daño oxidativo

**Daño oxidativo a lípidos.** No se detectaron diferencias en los niveles plasmáticos de MDA entre las gestaciones únicas y las gemelares ni entre los embarazos espontáneos con los de TRA (Tabla 15).

**Daño oxidativo a proteínas.** No se detectaron diferencias en los niveles en plasma de proteínas carboniladas entre las gestaciones únicas y las gestaciones gemelares. Tampoco se encontraron diferencias entre embarazos espontáneos y embarazos TRA (Tabla 15).

**Tabla 15.** Daño oxidativo a lípidos y proteínas en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción.

	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
<b>MDA</b> ( $\mu\text{mol/L}$ )	5.8 $\pm$ 40.3 (91)	5.6 $\pm$ 20.2 (96)	5.6 $\pm$ 40.3 (118)	6.0 $\pm$ 17.5 (70)
<b>Proteínas Carboniladas</b> (nmol/mg proteína)	0.5 $\pm$ 3.5 (91)	0.7 $\pm$ 2.4 (96)	0.6 $\pm$ 2.9 (118)	0.6 $\pm$ 3.5 (70)

MDA, Malondialdehído; TRA, Técnicas de Reproducción Asistida. Los datos representan la mediana $\pm$  rango intercuartílico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

**Daño oxidativo plasmático global (Prooxy-S).** No se encontraron diferencias significativas en el *score* Prooxy-S entre gestaciones únicas (0.005 $\pm$ 0.08 unidades arbitrarias; n=78) y gemelares (0.004 $\pm$ 0.07 unidades arbitrarias; n=83). Tampoco se encontraron diferencias entre embarazos espontáneos y TRA (espontáneo=0.003 $\pm$ 0.07, n=98; TRA=0.004 $\pm$ 0.008 unidades arbitrarias, n=68).

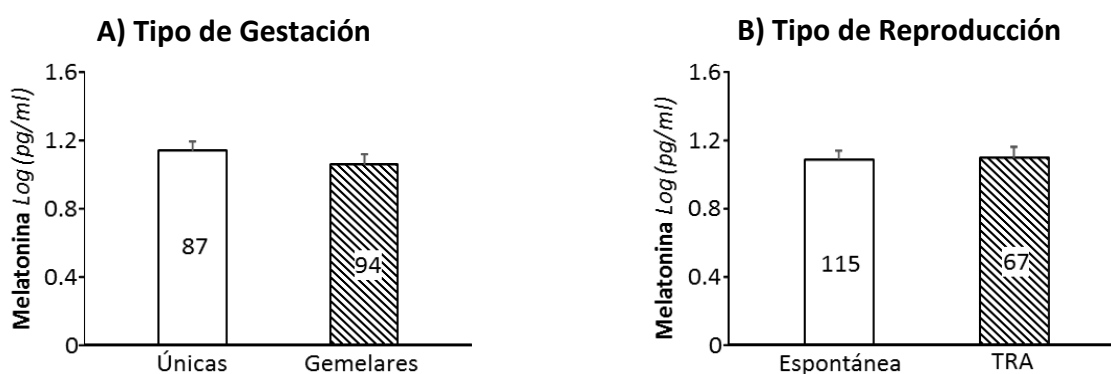
**Balance oxidativo plasmático global (Global-S).** Las gestaciones únicas presentaron un Global-S positivo (0.01 $\pm$ 3.6 unidades arbitrarias; n=91) mientras que las gestaciones gemelares fue negativo (-0.17 $\pm$ 4.0 unidades arbitrarias; n=96), aunque las diferencias no alcanzaron la significancia estadística.

Las gestaciones espontáneos presentaron un Global-S positivo (0.03 $\pm$ 3.6 unidades arbitrarias; n=118) mientras que las gestaciones TRA fue negativo (-0.22 $\pm$ 4.0 unidades arbitrarias; n=70), aunque las diferencias no alcanzaron la significancia estadística.



## 3.2.3. Hormonas

**Melatonina.** Los niveles diurnos de melatonina plasmática no presentaron diferencias significativas al comparar las gestaciones únicas con las gemelares (Figura 37A). Tampoco se detectaron diferencias entre embarazos espontáneos con los embarazos TRA (Figura 37B).

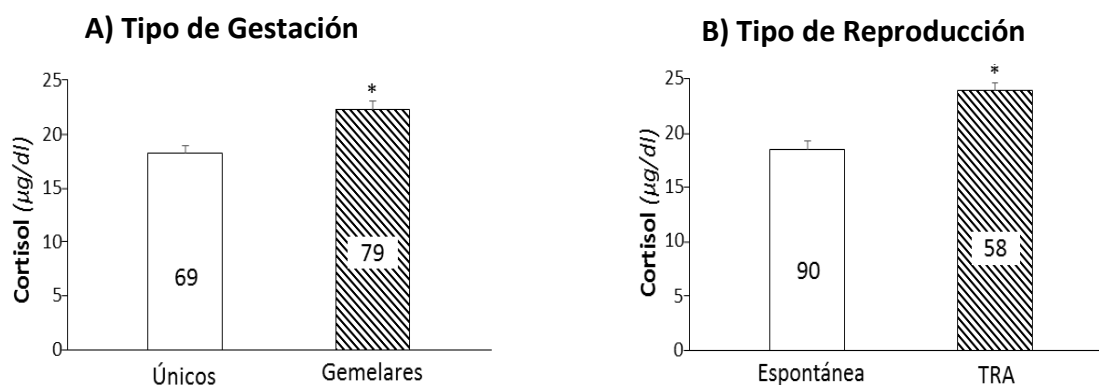


**Figura 37.** Niveles diurnos de melatonina plasmática en función del tipo de gestación (A) o del tipo de reproducción (B). Los datos representan la media±error típico. Dentro de la barra se indica el número de casos.

En las gestaciones gemelares, los niveles diurnos de melatonina correlacionaron positivamente con el peso de los recién nacidos ( $r=0.269$ ;  $p=0.04$ ).

**Cortisol.** Los niveles plasmáticos de cortisol fueron significativamente mayores en las gestaciones gemelares en comparación con las únicas (Figura 38A).

El cortisol plasmático también fue más elevado en los embarazos procedentes de TRA en comparación con los espontáneos (Figura 38B).



**Figura 38.** Niveles plasmáticos de cortisol en función del tipo de gestación (A) o del tipo de reproducción (B). Los datos representan la media±error típico. Dentro de la barra se indica el número de casos. \* $p<0.05$ ; prueba T de Student.

## 3.2.4. Citoquinas

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, MCP-1 ni TNF- $\alpha$  entre las gestaciones gemelares y las únicas.

Tampoco se detectaron diferencias en los niveles de citoquinas al comparar los embarazos espontáneos con los derivados de TRA (Tabla 16).

**Tabla 16.** Niveles de citoquinas en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción.

	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
<b>IL-1<math>\beta</math></b> (pg/ml)	8.3 $\pm$ 2.6 (69)	4.7 $\pm$ 0.8 (77)	7.9 $\pm$ 2.1 (86)	4.3 $\pm$ 0.9 (60)
<b>IL-8</b> (pg/ml)	7.0 $\pm$ 1.6 (69)	3.8 $\pm$ 0.8 (77)	6.2 $\pm$ 1.3 (86)	4.2 $\pm$ 1.0 (60)
<b>IL-10</b> (pg/ml)	0.2 $\pm$ 0.02 (69)	0.3 $\pm$ 0.1 (77)	0.2 $\pm$ 0.1 (86)	0.2 $\pm$ 0.03 (60)
<b>MCP-1</b> (pg/ml)	138.2 $\pm$ 7.3 (69)	134.8 $\pm$ 10.0 (77)	130.5 $\pm$ 7.8 (86)	144.7 $\pm$ 10.4 (60)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b> (pg/ml)	0.8 $\pm$ 0.5 (69)	1.1 $\pm$ 0.7 (77)	0.7 $\pm$ 0.4 (86)	1.4 $\pm$ 0.9 (60)

*IL, Interlequina; MCP, Proteína quimiotáctica de Monocitos; TNF, Factor de Necrosis Tumoral.* Los datos representan la media $\pm$ error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

En los embarazos gemelares, los niveles de IL-8 fueron significativamente menores en aquellos que presentaron complicaciones fetales frente a los que no presentaron ninguna complicación fetal (sin complicaciones=5.3 $\pm$ 1.4 pg/ml, n=41; complicación fetal=1.6 $\pm$ 0.5 pg/ml, n=29; p=0.02).

#### 4. Características psicológicas

Las variables psicológicas se midieron a través de un conjunto de aplicaciones en cada uno de los trimestres de gestación (Tabla 17). Éstas aplicaciones tuvieron una tasa de respuesta del 91.5% en el primer trimestre, del 79.5% en el segundo trimestre y del 65.5% en el tercer trimestre de gestación. Las pérdidas de seguimiento se debieron a cambios de centro hospitalario, abortos, partos anteriores a la fecha de recogida de datos o pérdidas de cuestionarios por parte de las embarazadas.

En el apartado 4.1. se analizan la influencia de factores psicológicos sobre el desarrollo de complicaciones maternas o fetales. En el apartado 4.2. se describe la influencia del tipo de gestación y reproducción sobre las características psicológicas.

**Tabla 17.** Análisis descriptivo global de las variables psicológicas.

Variable	Media	DE	Asimetría	Curtosis	Rango
<b>Afectividad Negativa 1º trimestre</b>	2.0	0.7	1.0	0.8	
<b>Afectividad Negativa 2º trimestre</b>	2.0	0.6	0.8	0.4	
<b>Afectividad Negativa 3º trimestre</b>	2.1	0.7	0.6	-0.1	
<b>Afectividad Positiva 1º trimestre</b>	3.3	0.6	-0.6	1.0	1 - 5
<b>Afectividad Positiva 2º trimestre</b>	3.4	0.5	-0.4	0.1	
<b>Afectividad Positiva 3º trimestre</b>	3.5	0.5	-0.4	-0.1	
<b>Ansiedad 1º trimestre</b>	0.9	0.5	0.8	0.6	
<b>Ansiedad 2º trimestre</b>	1.1	0.6	0.6	-0.3	0 - 3
<b>Ansiedad 3º trimestre</b>	1.2	0.6	0.4	-0.5	
<b>Preocupaciones del embarazo 1º trimestre</b>	1.7	0.6	0.7	3.0	
<b>Preocupaciones del embarazo 2º trimestre</b>	1.7	0.5	-0.2	-0.6	0 - 3
<b>Preocupaciones del embarazo 3º trimestre</b>	1.8	0.5	0.0	0.0	
<b>Optimismo disposicional 1º trimestre</b>	3.5	0.7	0.5	-0.9	1 - 5
<b>Optimismo disposicional 3º trimestre</b>	3.4	0.6	0.8	0.2	
<b>Satisfacción vital 2º trimestre</b>	5.5	0.9	-1.2	1.7	1 - 7
<b>Satisfacción vital 3º trimestre</b>	5.3	1.0	-1.1	1.9	
<b>Recursos generales 1º trimestre</b>	1.9	0.7	1.5	2.6	1 - 5
<b>Recursos generales 2º trimestre</b>	2.1	0.6	1.4	3.2	
<b>Resiliencia 1º trimestre</b>	5.9	0.6	-0.7	0.3	1 - 7
<b>Conciliación laboral y personal 2º trimestre</b>	0.9	0.7	0.4	-0.8	0 - 3
<b>Depresión 3º trimestre</b>	0.7	0.5	0.9	1.5	0 - 3

DE, Desviación estándar.

Las correlaciones entre las escalas psicológicas se muestran en la tabla 18, las correlaciones entre las escalas psicológicas y los parámetros biológicos se irán exponiendo a lo largo del apartado.

**Tabla 18.** Correlaciones entre las variables psicológicas estudiadas en este trabajo.

Variable/escala	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1. <b>Afectividad negativa</b> 1ºT	(0.8)																				
2. <b>Afectividad negativa</b> 2ºT	0.6*	(0.8)																			
3. <b>Afectividad negativa</b> 3ºT	0.6*	0.7*	(0.8)																		
4. <b>Afectividad positiva</b> 1ºT	-0.1	-0.1	-0.1	(0.8)																	
5. <b>Afectividad positiva</b> 2ºT	-0.2*	-0.3*	-0.2	0.5*	(0.7)																
6. <b>Afectividad positiva</b> 3ºT	-0.3*	-0.3*	-0.3*	0.5*	0.6*	(0.7)															
7. <b>Ansiedad</b> 1ºT	0.7*	0.5*	0.5*	-0.3*	-0.2*	-0.3*	(0.7)														
8. <b>Ansiedad</b> 2ºT	0.4*	0.7*	0.6*	-0.2	-0.3*	-0.3*	0.5*	(0.8)													
9. <b>Ansiedad</b> 3ºT	0.4*	0.5*	0.7*	-0.1	-0.1	-0.3*	0.4*	0.6*	(0.8)												
10. <b>Preocupaciones del embarazo</b> 1ºT	0.3*	0.2	0.3*	-0.2*	-0.1	0.1	0.3*	0.1	0.2*	(0.7)											
11. <b>Preocupaciones del embarazo</b> 2ºT	0.3*	0.3*	0.5*	-0.1	-0.2*	-0.2	0.4*	0.4*	0.3*	0.5*	(0.7)										
12. <b>Preocupaciones del embarazo</b> 3ºT	0.2	0.2	0.3*	-0.1	0.1	0.1	0.2*	0.1	0.1	0.5*	0.6*	(0.8)									
13. <b>Optimismo disposicional</b> 1ºT	-0.2*	-0.3*	-0.1	0.3*	0.2*	0.3*	-0.4*	-0.2*	-0.2*	-0.2*	-0.2*	-0.1	(0.6)								
14. <b>Optimismo disposicional</b> 3ºT	-0.2*	-0.2*	-0.2	0.2	0.1	0.4*	-0.3*	-0.4*	-0.4*	0.1	-0.1	0.1	0.6*	(0.6)							
15. <b>Satisfacción vital</b> 2ºT	-0.1	-0.3*	-0.3*	0.1	0.2*	0.2	-0.2	-0.3*	-0.3*	-0.2*	-0.3*	-0.2	0.2*	0.2*	(0.9)						
16. <b>Satisfacción vital</b> 3ºT	-0.3*	-0.3*	-0.3*	0.1	0.2*	0.3*	-0.2*	-0.4*	-0.5*	-0.2*	-0.3*	-0.1	0.1	0.3*	0.7*	(0.9)					
17. <b>Recursos generales</b> 1ºT	0.2*	0.1	0.2*	-0.1	-0.2	-0.1	0.3*	0.1	0.2*	0.1	-0.1	-0.2	-0.1	-0.1	-0.2*	-0.2*	(0.8)				
18. <b>Recursos generales</b> 2ºT	0.2*	0.2*	0.2*	-0.2*	-0.2*	-0.1	0.2*	0.3*	0.1	0.1	0.3*	0.2*	-0.1	-0.2	-0.4*	-0.3*	0.1	(0.9)			
19. <b>Resiliencia</b> 1ºT	-0.3*	-0.4*	-0.3*	0.3*	0.3*	0.2*	-0.4*	-0.3*	-0.3*	-0.2*	-0.2	-0.1	0.4*	0.2*	0.3*	0.3*	-0.3*	-0.3*	(0.6)		
20. <b>Conflictos laboral y personal</b> 2ºT	0.2*	0.2*	0.3*	-0.1	-0.2	-0.1	0.3*	0.4*	0.2*	0.2*	0.3*	0.2	-0.1	-0.1	-0.3*	-0.2*	0.1	0.2*	-0.1	(0.9)	
21. <b>Depresión</b> 3ºT	0.4*	0.4*	0.5*	-0.1	-0.2	-0.4*	0.3*	0.4*	0.7*	0.2*	0.3*	0.1	-0.2	-0.4*	-0.3*	-0.6*	0.3*	0.2*	-0.2*	0.2	(0.8)

T, Trimestre. Entre paréntesis se indica el  $\alpha$  de Cronbach. \* $p < 0.05$ ; Correlaciones de Pearson.

#### 4.1. Características psicológicas en función de las complicaciones maternas y fetales

##### 4.1.1. Escala de afectividad negativa/positiva

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas ni en las puntuaciones de afectividad negativa ni en las puntuaciones de afectividad positiva al comparar las gestaciones con o sin complicaciones maternas o fetales (Tabla 19).

**Tabla 19.** Puntuaciones en la escala de afectividad negativa/positiva en función de las complicaciones maternas y fetales.

	Trimestre de gestación	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
		No	Si	No	Si
<b>Afectividad Negativa</b>	<b>1º</b>	1.9±0.1 (57)	2.1±0.1 (41)	1.9±0.1 (75)	2.0±0.1 (18)
	<b>2º</b>	1.9±0.1 (57)	2.1±0.1 (41)	1.9±0.1 (75)	2.1±0.1 (18)
	<b>3º</b>	2.0±0.1 (57)	2.2±0.1 (41)	2.1±0.1 (75)	2.2±0.1 (18)
<b>Afectividad Positiva</b>	<b>1º</b>	3.4±0.1 (57)	3.3±0.1 (41)	3.3±0.1 (75)	3.3±0.1 (18)
	<b>2º</b>	3.4±0.1 (57)	3.4±0.1 (41)	3.5±0.1 (75)	3.3±0.1 (18)
	<b>3º</b>	3.5±0.1 (57)	3.4±0.1 (41)	3.5±0.1 (75)	3.5±0.1 (18)

Puntuaciones en escala tipo Likert desde 1 ("muy poco o nada") hasta 5 ("extremadamente"). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

Se encontraron diversas correlaciones entre las escalas de afectividad y el peso al nacer. Se encontró una correlación negativa entre el peso de los neonatos y las puntuaciones en la escala de afectividad negativa, medidas en el 1º trimestre ( $r=-0.217$ ;  $p=0.007$ ) y en el 2º trimestre de gestación ( $r=-0.214$ ;  $p=0.014$ ). Por otro lado, se encontraron correlaciones positivas entre el peso de los recién nacidos y las puntuaciones en afectividad positiva medidas en el 2º trimestre ( $r=0.231$ ;  $p=0.008$ ) y en el 3º trimestre de gestación ( $r=0.194$ ;  $p=0.044$ ).

#### 4.1.2. Escala hospitalaria de ansiedad

Las puntuaciones en la escala hospitalaria de ansiedad a lo largo de la gestación no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre madres que desarrollaron complicaciones maternas y las que tuvieron una gestación normal (Tabla 20).

Las puntuaciones en la escala de ansiedad fueron más altas en aquellas mujeres que desarrollaron complicaciones fetales en comparación con las que no las desarrollaron. Las mujeres que tuvieron partos prematuros puntuaron significativamente más alto en la escala hospitalaria de ansiedad que aquellas con partos a término (Tabla 20).

**Tabla 20.** Puntuaciones en la escala hospitalaria de ansiedad en función de las complicaciones maternas y fetales.

Trimestre de gestación	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales		
	No	Si	No	Si	Prematuros
1º	0.9±0.1 (66)	1.0±0.1 (48)	0.9±0.04 (66)	1.1±0.1* (22)	1.1±0.1* (18)
2º	1.1±0.1 (66)	1.2±0.1 (48)	1.1±0.1 (66)	1.3±0.1* (22)	1.3±0.1* (18)
3º	1.1±0.1 (66)	1.3±0.1 (48)	1.1±0.1 (66)	1.3±0.14* (22)	1.4±0.1* (18)

Puntuaciones en escala tipo Likert desde 0 ("nada") hasta 3 ("mucho"). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos. \* $p < 0.05$ ; *Modelo lineal general para medidas repetidas*

Se encontró una correlación positiva entre niveles de leucocitos en sangre en el 1º trimestre y las puntuaciones en la escala de ansiedad tanto en el 2º trimestre ( $r=0.184$ ;  $p=0.038$ ) como en el 3º trimestre de gestación ( $r=0.359$ ;  $p=0.001$ ).

#### 4.1.3. Escala de preocupaciones durante el embarazo

En el test se preguntaba a las mujeres sobre las siguientes posibles preocupaciones: la salud y mortalidad del neonato, a su pérdida de atractivo físico posterior a la gestación, sus problemas económicos, la atención médica y anestesia en el parto, sobre el efecto sobre la gestación de su propia medicación, entre otras. El estudio reveló que estas cuestiones solían preocupar de forma moderada a las embarazadas. En todos los grupos analizados, las puntuaciones fueron más elevadas al final de la gestación con respecto al inicio. No se encontraron diferencias estadísticamente

significativas al comparar los resultados de mujeres que desarrollaron complicaciones maternas y fetales con aquellas que tuvieron un embarazo normal (Tabla 21).

**Tabla 21.** Puntuaciones en la escala de preocupaciones durante el embarazo en función de complicaciones maternas y fetales.

Trimestre de gestación	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
	No	Si	No	Si
1º	1.7±0.1 (67)	1.7±0.1 (47)	1.7±0.1 (90)	1.6±0.1 (21)
2º	1.7±0.1 (67)	1.8±0.1 (47)	1.7±0.1 (90)	1.7±0.1 (21)
3º	1.8±0.1 (67)	1.8±0.1 (47)	1.8±0.1 (90)	1.8±0.1 (21)

Puntuaciones en escala tipo Likert desde 0 ("nada") hasta 3 ("mucho"). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

#### 4.1.4. Escala de optimismo disposicional

La escala de optimismo disposicional se evaluó en el 1º y 3º trimestre. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las gestaciones con complicaciones maternas con las gestaciones que no desarrollaron estas complicaciones (Tabla 22).

Las puntuaciones de la escala de optimismo disposicional fueron estadísticamente más elevadas en los embarazos que desarrollaron complicaciones fetales en comparación con los embarazos que no tuvieron complicaciones fetales (Tabla 22).

**Tabla 22.** Puntuaciones en la escala de optimismo disposicional en función de las complicaciones maternas y fetales.

Trimestre de gestación	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
	No	Si	No	Si
1º	3.5±0.1 (67)	3.5±0.1 (51)	3.5±0.1 (92)	3.6±0.1* (22)
3º	3.3±0.1 (67)	3.4±0.1 (51)	3.4±0.1 (92)	3.6±0.1* (22)

Puntuaciones en escala tipo Likert desde 1 ("poco") hasta 5 ("mucho"). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos. \* $p < 0.05$ ; *Modelo lineal general para medidas repetidas*



Las puntuaciones en optimismo disposicional correlacionaron positivamente con los niveles de compuestos fenólicos en plasma en el 1º trimestre ( $r=0.340$ ;  $p=0.001$ ) y en el 3º trimestre de gestación ( $r=0.322$ ;  $p=0.001$ ). Las puntuaciones en optimismo disposicional al inicio de la gestación también correlacionaron de forma positiva con los niveles diurnos de melatonina plasmática ( $r=0.171$ ;  $p=0.026$ ).

#### 4.1.5. Escala de satisfacción vital

La escala de satisfacción vital se evaluó en el 2º y en el 3º trimestre de gestación. No se encontraron diferencias significativas entre mujeres con o sin complicaciones maternas (Tabla 23).

Tampoco se detectaron diferencias estadísticas al comparar las gestaciones con complicaciones fetales con respecto a las gestaciones que no tuvieron complicaciones fetales (Tabla 23).

**Tabla 23.** Puntuaciones en la escala de satisfacción vital en función de las complicaciones maternas y fetales.

Trimestre de gestación	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
	No	Si	No	Si
2º	5.6±0.1 (69)	5.4±0.1 (47)	5.5±0.1 (92)	5.4±0.2 (21)
3º	5.5±0.1 (69)	5.2±0.1 (47)	5.4±0.1 (92)	5.3±0.2 (21)

Puntuaciones en escala tipo Likert desde 1 ("totalmente en desacuerdo") hasta 7 ("totalmente de acuerdo"). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

Se detectó una correlación negativa entre los niveles de leucocitos en sangre en el 1º trimestre y las puntuaciones en la escala de satisfacción vital en el 3º trimestre ( $r=-0.222$ ;  $p=0.023$ ).

#### 4.1.6. Escala de recursos generales

Las escalas de recursos generales se evaluaron en el 1º y 2º trimestre de gestación. Los recursos generales son una variable que mide la apreciación psicológica que tienen las mujeres sobre la capacidad de resolución de problemas y nivel de recursos en áreas relacionadas con: problemática económica, satisfacción emocional, valoración de la salud, apoyos familiares y amistad, práctica de ejercicio físico, relaciones sociales o correcta alimentación.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas al comparar los embarazos que desarrollaron complicaciones maternas y fetales en relación con los que no las desarrollaron (Tabla 24).

**Tabla 24.** Puntuaciones en la escala de recursos generales en función de complicaciones maternas y fetales.

Trimestre de gestación	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
	No	Si	No	Si
1º	1.9±0.1 (79)	1.9±0.1 (60)	2.0±0.1 (96)	1.9±0.1 (40)
2º	2.1±0.1 (79)	2.1±0.1 (60)	2.1±0.1 (96)	2.1±0.1 (40)

Puntuaciones en escala tipo Likert desde 1 (pocos recursos) hasta 5 (muchos recursos). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

#### 4.1.7. Escala de resiliencia

La Resiliencia -capacidad de afrontamiento de dificultades y problemas- sólo fue evaluada en el 1º trimestre de gestación. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los embarazos que desarrollaron complicaciones maternas y fetales con las gestaciones que no las desarrollaron (Tabla 25).

**Tabla 25.** Puntuaciones en la escala de resiliencia en función de las complicaciones maternas y fetales.

Trimestre de gestación	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
	No	Si	No	Si
1º	6.0±0.1 (91)	5.9±0.1 (77)	5.9±0.1 (118)	6.0±0.1 (40)

Puntuaciones en escala tipo Likert desde 1 (ninguna) hasta 7 (total). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

#### 4.1.8. Escala de conciliación del ámbito laboral y personal

Los problemas de conciliación en el ámbito laboral y personal sólo se evaluó en el 2º trimestre de gestación. No se detectaron diferencias en las puntuaciones de la escala de conciliación laboral y personal al comparar las mujeres que no desarrollaron complicaciones maternas con las que si las desarrollaron (Tabla 26).

Las puntuaciones en la escala de problemas de conciliación laboral y familiar fueron mayores en las mujeres que desarrollaron complicaciones fetales durante la gestación en comparación con las madres que no desarrollaron complicaciones fetales (Tabla 26).

**Tabla 26.** Puntuaciones en la escala de conciliación del ámbito laboral y personal en función de las complicaciones maternas y fetales.

Trimestre de gestación	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
	No	Si	No	Si
2º	0.8±0.1 (67)	1.0±0.1 (67)	0.8±0.1 (95)	1.1±0.1* (33)

Puntuaciones en escala tipo Likert desde 0 (máxima) hasta 3 (nula). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos. \* $p < 0.05$ ; Prueba T de Student.

Se encontró una correlación positiva entre los leucocitos en sangre evaluados en el 1º trimestre y las puntuaciones en la escala de problemas de conciliación laboral y personal en el 2º trimestre de gestación ( $r=0.195$ ;  $p=0.034$ ).

#### 4.1.9. Escala hospitalaria de depresión

La escala de depresión se evaluó solamente en el 3º trimestre. No se detectaron diferencias en las puntuaciones de la escala de depresión al comparar las gestaciones con o sin complicaciones maternas o fetales (Tabla 27).

**Tabla 27.** Puntuaciones en la escala hospitalaria de depresión en función de las complicaciones maternas y fetales.

Trimestre de gestación	Complicaciones Maternas		Complicaciones Fetales	
	No	Si	No	Si
3º	0.7±0.1 (61)	0.8±0.1 (63)	0.7±0.1 (97)	0.8±0.1 (21)

Puntuaciones en escala tipo Likert desde 0 (nada) hasta 3 (mucho). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

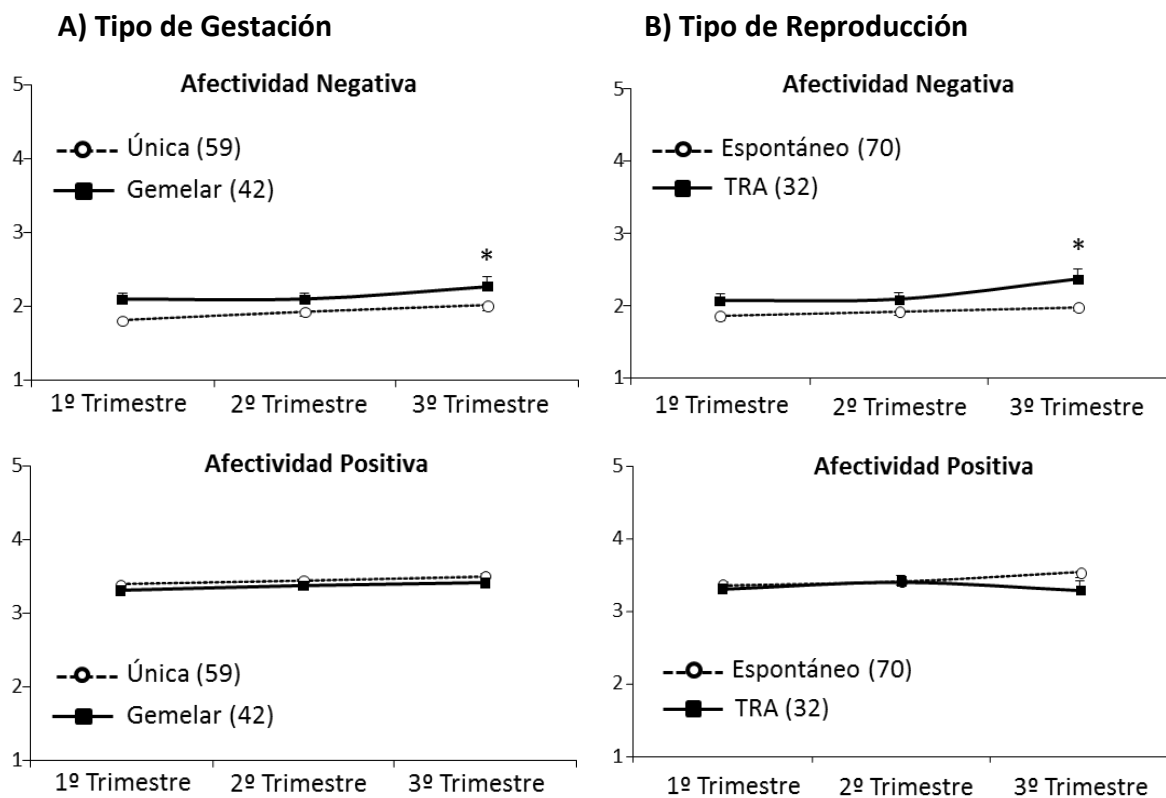
Se encontró una correlación positiva entre los niveles de leucocitos en sangre en el 1º trimestre y las puntuaciones en la escala de depresión ( $r=0.342$ ;  $p=0.001$ ). Por otro lado, se detectó una correlación negativa entre las puntuaciones en la escala de resiliencia en el 1º trimestre y las puntuaciones en la escala hospitalaria de depresión ( $r=-0.193$ ;  $p=0.033$ ).

4.2. Características psicológicas en función del tipo de gestación y tipo de reproducción

4.2.1. Escala de afectividad negativa/positiva

Las puntuaciones en afectividad negativa fueron significativamente mayores en las gestaciones gemelares comparadas con las únicas (Figura 39A). Dichas puntuaciones también fueron más altas en los embarazos con TRA en comparación con los espontáneos (Figura 39B).

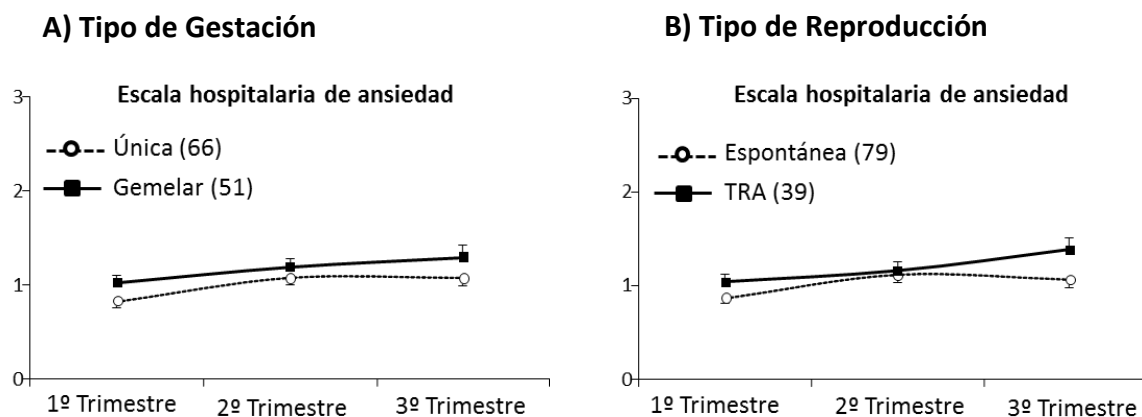
No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las puntuaciones de la escala de afectividad positiva ni al comparar las complicaciones maternas ni fetales con las mujeres que no desarrollaron estas complicaciones.



**Figura 39.** Escala de afectividad negativa y positiva en función del tipo de gestación (A) y el tipo de reproducción (B). Escala Likert: desde 1, muy poco o nada; hasta 5, extremadamente. Los datos representan la media±error típico. Entre paréntesis se muestra el número de casos. TRA, Técnicas de Reproducción Asistida. \* $p<0.05$ .; Modelo lineal general para medidas repetidas.

#### 4.2.2. Escala hospitalaria de ansiedad

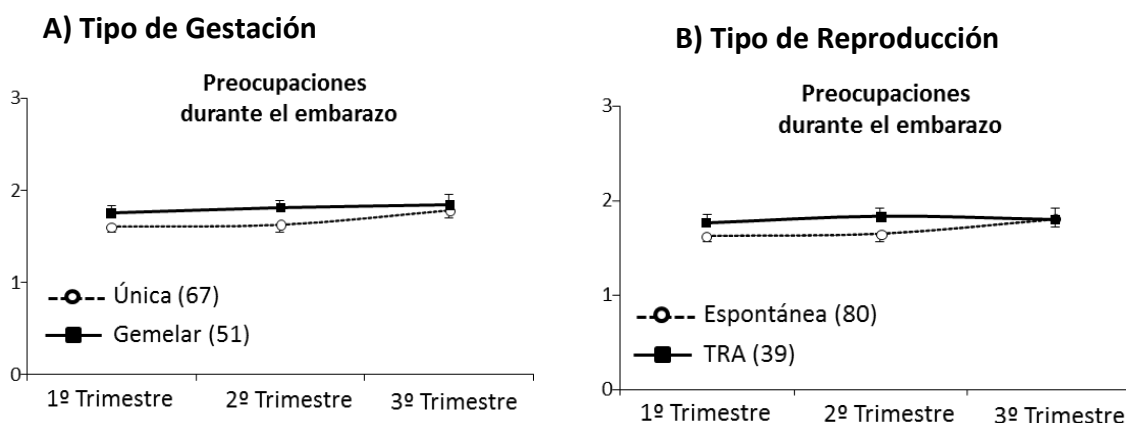
Estas puntuaciones no mostraron diferencias estadísticamente significativas ni al comparar las gestaciones gemelares en comparación con las únicas (Figura 40A) ni en los embarazos procedentes de técnicas de reproducción asistida (TRA) en comparación con las gestaciones espontáneas (Figura 40B).



**Figura 40.** Puntuaciones en la escala hospitalaria de ansiedad en función del tipo de gestación (A) y el tipo de reproducción (B). Escala Likert: 0 ("nada") hasta 3 ("mucho"). Los datos representan la media±error típico. Entre paréntesis se muestra el número de casos. TRA, Técnicas de Reproducción Asistida.

#### 4.2.3. Escala de preocupaciones durante el embarazo

No se detectaron diferencias significativas entre las gestaciones únicas en comparación con las gestaciones gemelares (Figura 41A). No se detectaron diferencias en las puntuaciones de la escala al comparar los embarazos espontáneos con los derivados de TRA (Figura 41B).



**Figura 41.** Puntuaciones en la escala de preocupaciones durante el embarazo en función del tipo de gestación (A) y el tipo de reproducción (B). Escala Likert: 0 ("nada") hasta 3 ("mucho"). Los datos representan la media±error típico. Entre paréntesis se muestra el número de casos. TRA, Técnicas de Reproducción Asistida.

## 4.2.4. Escala de optimismo disposicional

El optimismo disposicional se evaluó en el 1º y 3º trimestre de gestación. No se detectaron diferencias en la escala de optimismo al comparar los embarazos únicos con los gemelares ni los espontáneos con TRA (Tabla 28).

**Tabla 28.** Puntuaciones en la escala de optimismo disposicional en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción.

Trimestre de gestación	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
1º	3.4±0.1 (68)	3.3±0.1 (53)	3.5±0.1 (80)	3.4±0.1 (42)
3º	3.5±0.1 (68)	3.4±0.1 (53)	3.4±0.1 (80)	3.3±0.1 (42)

TRA, Técnicas de Reproducción Asistida. Puntuaciones en escala tipo Likert desde 1 ("poco") hasta 5 ("mucho"). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos

## 4.2.5. Escala de satisfacción vital

La escala de satisfacción vital fue evaluada en el 2º y 3º trimestre de gestación. Las puntuaciones en esta escala fueron significativamente mayores en las gestaciones únicas comparadas con las gestaciones gemelares (Tabla 29).

No se detectaron diferencias al comparar los embarazos espontáneos con los de TRA (Tabla 29).

**Tabla 29.** Puntuaciones en la escala de satisfacción vital en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción.

Trimestre de gestación	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
2º	5.7±0.1 (68)	5.4±0.1* (51)	5.7±0.1 (82)	5.3±0.1 (38)
3º	5.6±0.1 (68)	5.0±0.1* (51)	5.5±0.1 (82)	5.0±0.12 (38)

TRA, Técnicas de Reproducción Asistida. Puntuaciones en escala tipo Likert desde 1 ("totalmente en desacuerdo") hasta 7 ("totalmente de acuerdo"). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos. \* $p < 0.05$ ; Modelo lineal general para medidas repetidas.

#### 4.2.6. Escala de recursos generales

La escala de recursos generales se evaluó en el 1º y 2º trimestre de gestación. No se detectaron diferencias en las puntuaciones de la escala de recursos generales ni comparando las gestaciones únicas frente a las gemelares ni las gestaciones espontáneas frente a las TRA (Tabla 30).

**Tabla 30.** Puntuaciones en la escala de recursos generales en función del tipo de gestación y el tipo de reproducción.

Trimestre de gestación	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
1º	1.8±0.1 (76)	2.0±0.1 (70)	1.9±0.1 (97)	2.0±0.1 (50)
2º	2.0±0.1 (76)	2.1±0.1 (70)	2.0±0.1 (97)	2.2±0.1 (50)

TRA, *Técnicas de Reproducción Asistida*. Puntuaciones en escala tipo Likert desde 1 (pocos recursos) hasta 5 (muchos recursos). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

#### 4.2.7. Escala de resiliencia

La escala de resiliencia sólo se evaluó en el 1º trimestre de gestación. No se detectaron diferencias en las puntuaciones de la escala de resiliencia ni al compararlas gestaciones únicas con las gemelares ni al comparar las gestaciones espontáneas con las derivadas de TRA (Tabla 31).

**Tabla 31.** Puntuaciones en la escala de resiliencia en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción.

Trimestre de gestación	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
1º	6.0±0.1 (89)	5.9±0.1 (90)	6.0±0.1 (115)	6.0±0.1 (65)

TRA, *Técnicas de Reproducción Asistida*. Puntuaciones en escala tipo Likert desde 1 (ninguna) hasta 7 (total). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

#### 4.2.8. Escala de conciliación del ámbito laboral y personal

La escala de conciliación del ámbito laboral y personal fue evaluada solamente en el 2º trimestre de gestación. No se detectaron diferencias en las puntuaciones de la escala ni comparando las gestaciones únicas frente a las gemelares ni las gestaciones espontáneas frente a las TRA (Tabla 32).

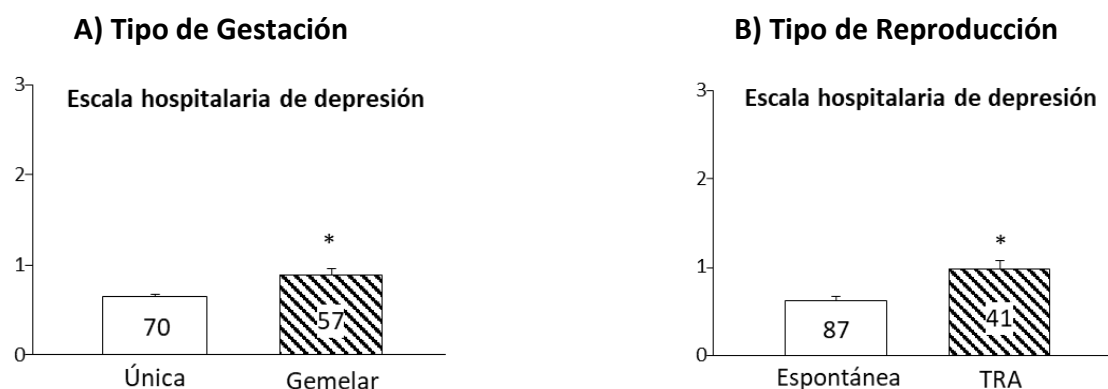
**Tabla 32.** Puntuaciones en la escala de conciliación del ámbito laboral y personal en función del tipo de gestación y del tipo de reproducción.

Trimestre de gestación	Tipo de Gestación		Tipo de Reproducción	
	Única	Gemelar	Espontánea	TRA
2º	0.9±0.1 (78)	1.0±0.1 (66)	0.9±0.1 (100)	1.0±0.1 (45)

TRA, *Técnicas de Reproducción Asistida*. Puntuaciones en escala tipo Likert desde 0 (máxima) hasta 3 (nula). Los datos representan la media±error típico; entre paréntesis se expresa el número de casos.

#### 4.2.9. Escala hospitalaria de depresión

La escala hospitalaria de depresión fue evaluada exclusivamente en el 3º trimestre. Las puntuaciones en la escala de depresión fueron estadísticamente mayores, tanto en los embarazos gemelares en comparación con los únicos (Figura 42A) como en las gestaciones de TRA en comparación con las espontáneas (Figura 42B).



**Figura 42.** Puntuaciones en la escala hospitalaria de depresión en función del tipo de gestación (A) y el tipo de reproducción (B). Dentro de las barras se indica el número de casos. Escala Likert desde 0 (nada) hasta 3 (mucho). Los datos representan la media±error típico. TRA, *Técnicas de Reproducción Asistida*. \* $p < 0.05$ . Prueba T de Student.



Se utilizó un modelo de regresión lineal para predecir el peso del recién nacido, utilizando las variables indicadas en la tabla 33. Dicho modelo predijo en un 43% la variable peso del recién nacido. Se demostró que el peso de los neonatos fue menor cuando las gestaciones procedían de TRA y las madres tenían más problemas para conciliar su ámbito laboral y personal a partir del segundo trimestre de gestación.

**Tabla 33.** Modelo de regresión tomando como variable criterio el peso del recién nacido.

Pasos y variables	$\beta$	$\Delta R^2$	$\Delta F$	P-value para $\Delta F$
<b>Paso 1: Antecedentes obstétricos</b>		0.37	9.73	0.00
Tipo de gestación ( <i>única frente a gemelar</i> )	0.21			
Tipo de reproducción ( <i>espontánea frente a TRA</i> )	-0.63*			
Abortos previos	0.11			
<b>Paso 2: Escalas negativas del 1º trimestre</b>		0.00	0.06	0.94
Afectividad negativa	-0.12			
Hospitalaria de ansiedad	0.28			
<b>Paso 3: Escalas positivas del 1º trimestre</b>		0.01	0.44	0.65
Optimismo disposicional	0.02			
Resiliencia	0.12			
<b>Paso 4: Parámetros hormonales</b>		0.03	1.27	0.29
Cortisol	-0.10			
Melatonina	0.10			
<b>Paso 5: Escalas negativas del 2º trimestre</b>		0.09	4.10	0.02
Conciliación del ámbito laboral y personal	-0.28*			
Preocupaciones durante el embarazo	0.05			
<b>Paso 6: Escalas positivas del 2º trimestre</b>		0.05	2.37	0.11
Recursos generales	0.23			
Satisfacción vital	0.25			

TRA, Técnicas de reproducción asistida.  $R^2 = 0.57$ ;  $R^2$  ajustada = 0.43; \* $p < 0.05$ . Modelo de regresión lineal.

# *Discusión*

## 1. El patrón de la maternidad actual

**Aspectos socioeconómicos.** Nuestra población de estudio presenta una edad media de maternidad de 34 años, que se encuentra por encima de la media española, establecida en 31 años y de la media de la Comunidad Autónoma de Madrid, que es de 32 años (Instituto Nacional de Estadística, 2016). Estos datos fueron obtenidos entre los años 2015-2016, por lo que nuestro estudio refleja la tendencia progresiva en el aumento de la edad de maternidad, al menos en una población urbana. En España, el patrón de la maternidad ha ido evolucionando rápidamente desde los años 80 a partir de los cuales se inició el retraso en la edad de maternidad y, en paralelo, el descenso en la tasa de natalidad (Ballezá et al., 2002), a medida que se fue incorporando la mujer al mercado laboral y se generalizó el concepto de planificación familiar. Nuestros datos son representativos de la sociedad española en el medio urbano y ponen de manifiesto el cambio en el concepto de la maternidad en las sociedades desarrolladas como demuestran datos de países en nuestro entorno socioeconómico (Bréart et al., 2003; Ventura et al., 2009; STATISTICS, 2007).

La edad de las mujeres del estudio, es superior a la edad biológica óptima para la gestación, que se estima entre los 20 y los 30 años, a partir de la cual empiezan a agotarse los folículos (Wallace y Kelsey, 2010). A medida que avanza la edad de la mujer van incrementándose los problemas de infertilidad y la necesidad de recurrir a técnicas de reproducción asistida (TRA). Aunque la infertilidad de la pareja pueda ser atribuida al varón, parece que la contribución de la edad de la mujer es más relevante (Dain et al., 2011). De hecho, las mujeres de nuestro estudio que accedieron a la maternidad mediante TRA tuvieron una edad superior a las que tuvieron un embarazo espontáneo y recurrieron a estas técnicas tras varios años de infertilidad. Esto justifica que, en la población estudiada, el número de embarazos con TRA sea alto (cerca al 37%). Hay que tener en cuenta que la alta proporción de TRA en nuestra población también está relacionada con los recursos económicos para acceder a estas técnicas. En España, aunque los tratamientos de fertilidad son financiados por el sistema público de salud, en numerosas ocasiones las parejas deben recurrir a centros privados de reproducción, por no reunir los requisitos exigidos o para reducir los tiempos de espera, lo que supone un coste económico. Nuestra población tiene acceso a estas

técnicas ya que, en su mayoría, está formada por mujeres con alto nivel educativo, con empleo y con elevados ingresos en el núcleo familiar.

En resumen, este estudio demuestra que la edad de maternidad tiene una tendencia al alza en sociedades industrializadas, con el consiguiente aumento de problemas de infertilidad y necesidad de reproducción asistida.

**Hábitos y estilos de vida.** Es bien conocido que el consumo de tabaco y alcohol durante la gestación son deletéreos ya que pueden tener efectos teratogénicos a altas concentraciones. Además, hay evidencia científica de que estos agentes tienen efectos perjudiciales para la salud materno-fetales, incluso a bajas concentraciones y si son consumidos en el periodo periconcepcional (Al-Gubory, 2016). Sin embargo, este hecho no es tan conocido por la población, que suele considerar que una baja exposición a estas sustancias no tiene repercusión en la salud gestacional. Así lo demuestra nuestro estudio, en el que más de 15% de las mujeres asumía ser fumadora durante la gestación, llegando en ocasiones a 12 cigarrillos/día. No se han encontrado datos recientes sobre el consumo de tabaco durante la gestación en España con los que comparar nuestro estudio. A pesar de que aún es elevado el hábito tabáquico en embarazadas, es cierto que ha ido mejorando el grado de concienciación sobre los efectos deletéreos del tabaco como demuestra el hecho de que en el año 2002 el porcentaje de madres fumadoras era del 30% (Martinez-Frias et al., 2005). Además, en este estudio se constató que el consumo era particularmente elevado en mujeres jóvenes y de bajo nivel educativo, por lo que es posible que la diferencia con nuestros datos se puede atribuir a que nuestra población tiene mayor edad y nivel educativo.

El consumo de tabaco se ha asociado a complicaciones maternas y fetales, incluyendo CIR y prematuridad (Al-Gubory, 2014). Se ha constatado que la entrada en vigor de la Ley nacional antitabaco iniciada en el 2005 con la reducción de la exposición al tabaco en lugares públicos, tuvo un impacto positivo sobre la prematuridad y el bajo peso al nacer, con un descenso en su incidencia (Simon et al., 2017). En la población de gestantes del estudio no se encontraron diferencias significativas en el desarrollo de complicaciones maternas o fetales en relación con el consumo de tabaco ni tampoco con el peso del recién nacido, lo cual puede ser debido

a un tamaño muestral insuficiente. Para poder concluir sobre la influencia del consumo de tabaco en la incidencia de las complicaciones materno-fetales habría que realizar estudios epidemiológicos que incluyan un alto número de individuos.

Numerosos estudios avalan que la ingesta de alcohol, aun siendo en mínimas cantidades, se asocia a mayor número de complicaciones materno-fetales, incluso durante el periodo periconcepcional (Nykjaer et al., 2014; Al-Gubory, 2016). En nuestra población, el consumo de alcohol fue elevado incluso más que el consumo de tabaco, como constata el hecho de que más de un 40% lo consume de forma esporádica y el 8% de forma sistemática los fines de semana. Nuestros datos parecen indicar que la población percibe como más dañinos los efectos del tabaco que los del alcohol sobre la gestación. Al igual que el tabaquismo, en nuestro estudio no se encontró una relación entre el consumo de alcohol y la incidencia de complicaciones maternas o fetales, lo que puede estar relacionado con un tamaño muestral insuficiente.

En resumen, de nuestro estudio se desprende que a pesar de tratarse de una población con alto nivel educativo, el consumo de tabaco y de alcohol sigue siendo elevado. La población tiene una percepción inadecuada sobre los efectos deletéreos que puede ocasionar el consumo de estas sustancias durante la gestación, incluso previo al embarazo, por lo que sería deseable dar a conocer esta información a mujeres que están planeando quedarse embarazadas.

**Hábitos nutricionales.** La población de estudio mantenía una dieta relativamente saludable incluyendo un consumo diario de frutas, verduras y lácteos. Los datos obtenidos en nuestro estudio son similares a los del Ministerio de Sanidad para mujeres de entre 25 y 44 años. Sin embargo, se ha constatado que el consumo de verduras o ensalada en mujeres ha ido decreciendo en España desde 2006 hasta la actualidad (Sistema Nacional de Salud, 2014). Con respecto al consumo de lácteos, aunque es elevado en nuestra población y superior a la media de mujeres españolas, están por debajo del consumo en la Unión Europea, como constatan los datos del Ministerio de Sanidad (Sistema Nacional de Salud, 2014).

El consumo de ácido fólico durante la gestación está ampliamente extendido en la población, como demuestran los datos de nuestro estudio, en el que casi la totalidad de las embarazadas lo tomaba como suplemento siguiendo la pauta de recomendación establecida por el Ministerio de Sanidad (Ministerio de Sanidad y Consumo<sup>^</sup> dDirección de Salud Pública, 2001). Esta recomendación está avalada por numerosos estudios científicos que demuestran que los folatos son esenciales en el periodo embrionario en el que las células son muy sensibles a su déficit (Charles et al., 2005). Es de destacar que, aunque el consumo de polivitamínicos no está incluido dentro de las recomendaciones durante el embarazo, también está muy extendido en la población, como demuestran nuestros datos donde cerca del 89% de las gestantes los tomaba de forma habitual. Esto podría ser un ejemplo de automedicación, ya que las embarazadas suelen considerar que no llegan a los aportes nutricionales necesarios en este periodo (Prendes Labrada, Marianela de la C et al., 2001). Sin embargo, no hay evidencia clínica de la necesidad de una suplementación con polivitamínicos siempre que se haga una dieta equilibrada, como demuestra una revisión sistemática de Cochrane, mientras que sí lo son efectivos en mujeres malnutridas, reduciendo la incidencia de bajo peso al nacer (Haider y Bhutta, 2015). Incluso algunos autores apuntan que un exceso de polivitamínicos podría ser deletéreo, debido a las posibles interacciones entre sus componentes. Así, se sabe que el hierro, a dosis altas, reduce la absorción de zinc, que resulta imprescindible durante el desarrollo fetal. Además, el hierro en exceso puede generar radicales libres a partir de la reacción de Fenton (Halliwell, 2013). Por otro lado, la vitamina C, aunque favorece la absorción de hierro, pueden disminuir la absorción de cobre, que actúa como cofactor enzimático, participando entre otros en la división celular durante la embriogénesis. También se ha descrito que dosis elevadas de vitamina A durante el embarazo tiene efectos teratogénicos. Nuestro estudio no demostró ningún efecto sobre la incidencia de complicaciones maternas o fetales y el consumo de polivitamínicos. Sin embargo, nuestros datos avalan que la población mantenía unos hábitos nutricionales acordes a las recomendaciones establecidas, que incluye cantidades suficientes de macro y micronutrientes, siendo innecesario el consumo de polivitamínicos. Sería necesario estudios epidemiológicos para evaluar el impacto de la automedicación con polivitamínicos durante la gestación.

En resumen, la población de estudio mantiene unos hábitos nutricionales adecuados lo que hace innecesario el consumo de polivitamínicos fuertemente extendido en la población de embarazadas. El impacto que pueda tener este consumo sobre la salud gestacional requiere de estudios epidemiológicos más amplios.

**Sueño.** Durante el embarazo suelen modificarse los hábitos de sueño de la mujer, debido a los cambios hormonales y emocionales que atraviesa en esta etapa y, en algunos casos, el descanso puede ser insuficiente. De hecho, en el presente estudio se constató que un porcentaje elevado de la población tenía percepción subjetiva de descanso insuficiente y una baja eficacia del sueño. Estos resultados podrían estar asociados con los niveles de melatonina, principal inductora del sueño, o con el estrés psicológico, relacionado con los niveles de cortisol. La hormona melatonina alcanza el máximo de secreción durante las horas de oscuridad y presenta una alta variabilidad interindividual (Reiter, 1998). Nuestros valores fueron obtenidos a las 9:00 am y, por tanto, no conocemos el valor máximo en cada gestante, sin embargo, es probable que los valores medidos sean un reflejo de la biodisponibilidad de melatonina en cada embarazada. De hecho, en nuestro estudio los niveles bajos de esta hormona se asociaron con menor satisfacción del sueño. Por otro lado, se detectaron mayores niveles de cortisol en aquellas mujeres con una menor eficacia del sueño (horas dormida/horas en la cama). Es posible que esta elevación del cortisol junto con peor eficacia del sueño esté relacionada con mayores preocupaciones, que conducen a estar muchas horas en la cama, pero sin dormir (Monk, 2001). De hecho, nuestros datos demuestran que los niveles de cortisol son más altos en mujeres con TRA y con gestaciones gemelares, que a su vez puntúan más alto en escalas psicológicas de procesos emocionales negativos. Estos datos son importantes ya que tanto la melatonina como el cortisol juegan un papel en el desarrollo fetal y el peso del recién nacido (Mastorakos y Ilias, 2003; Chen et al., 2013), que se discutirá más adelante.

En resumen, el inicio de la gestación se asocia con una peor calidad de sueño, que está relacionada con menores niveles de melatonina y niveles más altos de cortisol, que pueden estar relacionados con aspectos psicológicos.

## 2. Embarazos de alto riesgo y patologías materno-fetales

Una de las preocupaciones durante el periodo gestacional es la posible aparición de complicaciones maternas o fetales que puedan comprometer tanto la salud materna como la fetal. En este estudio se evaluó la incidencia de las complicaciones más frecuentes. En la población estudiada se evidenció una mayor incidencia de complicaciones maternas leves que la descrita en la literatura. Por otro lado, la incidencia de hipertensión gestacional (HTG) y preeclamsia (PE) fue menor que la descrita en España, mientras que la diabetes gestacional (DMG) estuvo por encima de la media española y europea (i Argente, 2005; Hutcheon et al., 2011; Posada Estrada et al., 2012). También fue similar a la población española la incidencia de crecimiento intrauterino retardado (CIR). Sin embargo, se encontró una prevalencia de prematuridad de un 25% que es muy superior a la media de la población europea en torno al 9% (Eurostat, 2015). Estos datos pueden estar derivados del alto porcentaje de embarazos gemelares en nuestra población, que es un factor de riesgo de la prematuridad (Goldenberg et al., 2008). De hecho, la tasa de estos embarazos en la población de estudio fue superior a la media europea (Eurostat, 2015), debido a haber reclutado la población en un entorno hospitalario. Además, la elevada tasa de prematuridad en nuestro estudio también puede deberse al porcentaje de embarazos TRA que se asocian con gestaciones múltiples.

En nuestro estudio, las gestaciones gemelares llevan asociadas mayor incidencia de complicaciones maternas y fetales. Estos resultados están en concordancia con los descritos en la literatura, en la que se indica que las gestaciones múltiples son consideradas de alto riesgo, por la mayor incidencia de patologías obstétricas y de riesgo de muerte fetal (de la Calle Fernández-Miranda et al., 2012).

Aunque el uso de TRA está cada vez más extendido en las sociedades occidentales, no se conoce aún si existe una asociación directa con el desarrollo de complicaciones maternas o fetales. El analizar este aspecto ha sido uno de los objetivos del presente trabajo. En nuestra población encontramos mayor prevalencia de estas complicaciones en mujeres con TRA, sin embargo, no parece que el uso de estas técnicas esté directamente relacionado con el desarrollo de complicaciones. Nuestros datos indican que, el uso de TRA se asocia de forma indirecta con las complicaciones obstétricas,



siendo los factores determinantes los embarazos gemelares y la elevada edad de maternidad, como pone de manifiesto el análisis univariante.

En nuestra población tenemos una prevalencia del 20% de bajo peso al nacer, muy por encima de la española situada en 8.7% (Simon et al., 2017). A ello contribuye de forma importante el alto número de gestaciones gemelares y de prematuridad encontrados en nuestra población. Gracias a los avances en la medicina perinatal, en las sociedades occidentales cada vez hay más supervivencia de neonatos de bajo peso, aunque con mayor riesgo morbilidad neonatal (Horbar et al., 2002). Cabe destacar que, un bajo peso al nacer tiene consecuencias a largo plazo, predisponiendo al individuo a un mayor riesgo de enfermedad cardiometabólica (Morton et al., 2016). Los datos de nuestro estudio van en consonancia con el aumento de la prematuridad en todo el mundo (Goldenberg et al., 2008). Es previsible que el cambio actual en el patrón de maternidad, asociado a neonatos con bajo peso al nacer, aumente la incidencia de enfermedades cardiovasculares en futuras generaciones.

En resumen, el cambio actual en el patrón de maternidad tiene consecuencias biológicas sobre la salud materno-fetal, lo que puede contribuir a incrementar la tasa de bajo peso al nacer y el desarrollo de enfermedades cardiometabólicas en futuras generaciones.

### 3. Aspectos biológicos y su impacto en la gestación

La incidencia de las complicaciones gestacionales está en aumento y además conlleva un riesgo de morbilidad materno-fetal. En la actualidad no existen biomarcadores que permitan una detección precoz de aquellas mujeres susceptibles de desarrollar una complicación o tener un mal resultado obstétrico. Por ello sería deseable encontrar un biomarcador de fácil acceso, en fluidos biológicos, de determinación sencilla y de bajo coste económico, que permita prevenir o disminuir el impacto de las patologías obstétricas.

La detección de un único biomarcador parece no ser una estrategia apropiada y se ha sugerido que es más adecuado incluir una combinación de biomarcadores plasmáticos junto con parámetros clínicos como ecografías (Wu et al., 2015a). Por lo tanto, uno de los objetivos de esta tesis ha sido evaluar posibles biomarcadores plasmáticos en etapas tempranas de la gestación. A continuación, se discuten los resultados relativos a los distintos biomarcadores evaluados.

#### 3.1. *Bioquímica y hematología*

Dentro de los parámetros bioquímicos de rutina en clínica, los triglicéridos y ácido úrico fueron los únicos que, al inicio de la gestación, se encontraron elevados en mujeres que desarrollaron algún tipo de patología, tanto materna como fetal.

Un estudio reciente evidencia un aumento del nivel de triglicéridos al inicio de la gestación, en mujeres que desarrollaron complicaciones fetales (Geraghty et al., 2017). Este estudio encuentra una asociación entre esta alteración en el perfil lipídico con un Índice de Masa Corporal (IMC) alto. Sin embargo, la mayor concentración de triglicéridos encontrada en las gestantes de nuestro estudio no se relaciona con sobrepeso ya que, las embarazadas tenían en todos los casos un IMC entre 20 y 25 Kg/m<sup>2</sup>. Por otro lado, también se ha descrito una elevación de los niveles plasmáticos de triglicéridos en mujeres con partos prematuros (Qiu et al., 2017) así como en mujeres con PE (Orhan et al., 2003). Esta elevación puede ser consecuencia de la propia patología, mientras que la elevación encontrada en nuestro estudio, al inicio de la gestación, sugiere que alteraciones en el metabolismo lipídico podrían ser un posible biomarcador del desarrollo posterior de complicaciones gestacionales.

El presente estudio también muestra que varios parámetros relacionados con el perfil lipídico (colesterol, triglicéridos y ALA-T) presentan valores más altos en gestaciones gemelares que en las únicas, aunque dentro del rango de normalidad, con la excepción de los triglicéridos. La misma tendencia se observó en gestaciones TRA, lo cual puede estar relacionado con que la mayoría son gestaciones gemelares, más que con la técnica de reproducción en sí misma. El aumento del perfil lipídico durante la gestación es algo normal, ya que los requerimientos energéticos y metabólicos de la mujer están cambiando, estimándose que las concentraciones de colesterol en una mujer gestante aumentan en torno al 70% con respecto a una mujer no embarazada y la concentración de triglicéridos, a partir del segundo trimestre, puede llegar a ser hasta 138% superior (Bartels et al., 2013). Es posible que el aumento del perfil lipídico en gestaciones gemelares esté relacionado con una mayor necesidad de movilización de nutrientes.

Otro parámetro bioquímico que se encontró elevado en complicaciones obstétricas fue el ácido úrico. Datos en la literatura indican que mujeres que tuvieron partos prematuros presentan elevación de ácido úrico al final de la gestación (Qiu et al., 2017). Así mismo, en mujeres con PE e HTG hay una relación entre hiperuricemia y un peor resultado obstétrico (Hawkins et al., 2012). Al igual que en otras ocasiones, estos datos se han encontrado en mujeres con una patología ya establecida. Nuestros resultados, analizados en una población sana, antes de establecerse cualquier complicación obstétrica sugieren que el ácido úrico también podría ser un marcador, junto con los triglicéridos, para identificar casos susceptibles de desarrollar patologías gestacionales. Estos resultados podrían ser fácilmente analizados mediante estudios epidemiológicos, ya que estos parámetros son determinados de manera rutinaria en todas las embarazadas en el primer trimestre.

Uno de los mecanismos que podrían explicar la asociación entre unos niveles elevados de ácido úrico y patología gestacional podría ser el estrés oxidativo. El ácido úrico puede actuar como antioxidante o como pro-oxidante (Sautin y Johnson, 2008), pudiendo promover un desequilibrio oxidativo cuando se encuentra a concentraciones elevadas. De hecho, se ha constatado que hay una correlación positiva entre niveles plasmáticos de ácido úrico y peroxidación lipídica en mujeres con PE (Barneo-Caragol

et al., 2018). Nuestros datos también evidencian una elevación de la peroxidación lipídica (MDA) en el grupo de mujeres que desarrollaron una complicación severa.

Aunque, en nuestro estudio, todos los parámetros hematológicos estuvieron en el rango de normalidad, se encontró una correlación negativa entre los niveles de leucocitos al inicio de la gestación y el peso del recién nacido. La elevación de los glóbulos blancos en el embarazo es una condición fisiológica normal, aunque esta elevación puede sugerir la presencia de infección. Como otros muchos sistemas, el sistema hematológico debe adaptarse durante la gestación, para acomodarse a las demandas del desarrollo fetal. Un desajuste en el recuento leucocitario, por encima o por debajo de los niveles normales, puede ocasionar complicaciones durante el embarazo (Sanci et al., 2017). Nuestros datos evidencian una correlación negativa entre los niveles de leucocitos al inicio de la gestación y el peso del recién nacido. Estos resultados podrían estar relacionados con el hecho de que debe haber una cierta inmunosupresión de los linfocitos B para que la implantación se desarrolle correctamente. Además, estudios recientes revelan que los niveles del factor activador de linfocitos B está incrementado al inicio de la gestación en aquellas mujeres que desarrollaron HTG (Stohl et al., 2017). El presente estudio tiene la limitación de que no se recogió información sobre las distintas poblaciones celulares de leucocitos, por lo que no es posible identificar cuál de todas las poblaciones celulares es la que tiene un efecto sobre el crecimiento fetal.

La correlación encontrada en nuestro estudio entre niveles elevados de leucocitos y algunas de las puntuaciones en escalas psicológicas negativas, junto al hecho de que la elevación inicial de leucocitos esté asociada con el desarrollo de patologías fetales, podría sugerir una influencia de los factores psicológicos maternos sobre el crecimiento del feto.

### *3.2. Biomarcadores del estado oxidativo plasmático*

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) juegan un papel esencial en la patogenia de múltiples enfermedades durante la gestación y el periodo neonatal. Durante el embarazo, se incrementa la demanda de oxígeno y como consecuencia aumenta la producción de ROS, incluso en las gestaciones que no desarrollan ninguna

complicación obstétrica. El incremento en la demanda de oxígeno para el crecimiento fetal se produce sobre la semana 10-12 de gestación, cuando se establece la circulación materno-fetal (Zusterzeel et al., 2001). Este aumento conlleva una elevación importante en la producción de ROS en la placenta que, en condiciones fisiológicas, lleva asociado un incremento simultáneo de los sistemas de defensa antioxidante (Jauniaux et al., 2000). Sin embargo, si no se produce dicho aumento se genera un desequilibrio a favor de sustancias pro-oxidantes, situación conocida como estrés oxidativo, que puede conducir a una complicación obstétrica (Wu et al., 2015a). De hecho, numerosos estudios avalan que complicaciones como la PE y la DMG se asocian a estrés oxidativo (Orhan et al., 2003; Llurba et al., 2004; Karacay et al., 2010). No obstante, la mayoría de los estudios se han realizado a partir de la semana 20 de gestación, cuando dichas complicaciones han sido diagnosticadas, por lo que no es posible concluir si el estrés oxidativo es causa o consecuencia de la patología. Por ello se eligió la semana 9 de gestación para evaluar uno de los objetivos de este estudio: evaluar el si un pobre estado antioxidante al inicio de la gestación puede ser considerado como biomarcador del desarrollo posterior de una patología obstétrica.

**Sistemas antioxidantes.** De acuerdo con la literatura, los embarazos con PE presentan al final de la gestación una actividad SOD reducida (Ilhan et al., 2002) y bajos niveles de antioxidantes de bajo peso molecular como GSH (Kaur et al., 2008) y grupos tiólicos (Llurba et al., 2004). Por otro lado, existe evidencia de que las mujeres con DMG tienen incrementada la actividad catalasa y reducida la actividad SOD (Djordjevic et al., 2004). Estos datos indican que una vez establecida la patología, aparecen disminuidos los niveles de antioxidantes en general, pudiendo encontrarse diferencias en función de la etiopatología. Nuestros datos revelan que en la semana 9 de gestación no existe un cambio en las actividades de enzimas antioxidantes, como SOD o catalasa, en ninguno de los grupos de estudio; mientras que los niveles de grupos tiólicos y de compuestos fenólicos fueron menores en los embarazos que desarrollaron complicaciones maternas, observándose una tendencia a niveles reducidos de GSH, particularmente en las mujeres que desarrollaron complicaciones severas. Estos antioxidantes son la primera línea de defensa frente a una elevación de ROS, por lo que su deficiencia temprana podría contribuir a la complicación.

Los sistemas antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos actúan de forma sinérgica, por lo que resulta interesante considerarlos de manera conjunta. En nuestro estudio, se realizó un cálculo del estado antioxidante global en plasma, Antiox-S, teniendo en cuenta todos los antioxidantes evaluados. El valor Antiox-S obtenido fue positivo en gestaciones sin complicaciones maternas, mientras que en las que si las desarrollaron fue negativo. Esto indica que estas embarazadas, en el primer trimestre de la gestación, ya presentan niveles globales de antioxidantes por debajo de la media poblacional.

En nuestra población de estudio no hemos detectado diferencias en los niveles de antioxidantes, tanto enzimáticos como de bajo peso molecular, en relación al desarrollo de complicaciones fetales, a excepción del GSH, que aparece reducido en las gestantes que presentaron complicaciones fetales. Al considerar de manera conjunta todos los antioxidantes, aunque su valor es negativo cuando hay complicaciones fetales -al igual que ocurría en el desarrollo de complicaciones maternas- no se detectaron diferencias significativas en el Antiox-S, probablemente debido al desequilibrio en el tamaño muestral.

Por otro lado, Junto a los antioxidantes endógenos, los procedentes de la dieta también pueden contribuir de forma importante en la capacidad antioxidante. Entre los antioxidantes exógenos cabe destacar las vitaminas y los compuestos fenólicos (Balasundram et al., 2006). Existen evidencias de que la vitamina E evita la degradación del óxido nítrico debida a ROS, lo que provoca un aumento del flujo útero-placentario, previniendo así la HTG (Takasaki et al., 2010). Otros estudios indican que tanto la vitamina E como la A están disminuidas en los embarazos con partos prematuros (Saker et al., 2008). En nuestra población se ha encontrado una asociación entre unos valores altos de Antiox-S y un consumo diario de frutas y verduras, así como una asociación entre este consumo de frutas y verduras con niveles altos de compuestos fenólicos en plasma, lo que indica que la dieta puede influir positivamente sobre el estado oxidativo global en la mujer gestante. Estos datos sugieren que una intervención nutricional adecuada puede contribuir a mejorar este estado oxidativo, evitando así el desarrollo de complicaciones gestacionales.

Cuando analizamos nuestra población en función del tipo de gestación, observamos que los niveles de antioxidantes en plasma, considerados de manera individual, no presentan diferencias entre gestaciones gemelares o únicas. Sin embargo, si hay una diferencia significativa en el Antiox-S, que tiene un valor positivo en las gestaciones gemelares. Esto podría atribuirse a que en las gestaciones gemelares son necesarios mayores niveles de sistemas antioxidantes que en las gestaciones únicas, para contrarrestar los niveles elevados de ROS. Nuestros resultados, no detectan alteración en los niveles de antioxidantes, considerados de manera individual o global, como consecuencia del uso de TRA.

Factores relacionados con el estilo de vida también influyen sobre el estado oxidativo del individuo. Así, se ha descrito que el consumo de alcohol durante la gestación se asocia con una disminución de antioxidantes en la madre y un aumento del estrés oxidativo fetal (Al-Gubory, 2014). Además, el consumo de tabaco durante la gestación acentúa la reducción de antioxidantes como las vitaminas (Chelchowska et al., 2011). En nuestro estudio no se detectó relación entre el valor Antiox-S y el consumo de alcohol o tabaco, probablemente debido al tamaño muestral, ya que para estudios con objetivos epidemiológicos es necesario una población más amplia.

En resumen, el valor Antiox-S podría ser un biomarcador temprano del desarrollo de complicaciones obstétricas. Al inicio de la gestación las gestantes tienen niveles mayores de ROS y menores niveles de antioxidantes que las mujeres no gestantes. Estos niveles de antioxidantes deberían ir incrementándose paulatinamente a lo largo de la gestación para balancear el incremento en los niveles de ROS. Cuando esto no ocurre, el estrés oxidativo resultante podría facilitar el desarrollo de complicaciones maternas o fetales. Una dieta adecuada podría contribuir a mejorar el balance oxidativo de las gestantes, evitando así la aparición de dichas complicaciones.

**Daño oxidativo.** Un aumento de especies reactivas implica daño a macromoléculas que, en última instancia, es uno de los factores responsables del establecimiento de una patología. Las primeras moléculas susceptibles de daño oxidativo son los lípidos, seguidamente, las proteínas y finalmente el ADN (Ortuno-Sahagun et al., 2014).

En nuestra población de estudio encontramos elevados niveles plasmáticos de malondialdehído (MDA; indicador de peroxidación lipídica) en las gestantes que desarrollaron complicaciones maternas severas. Estos resultados son similares a los encontrados en gestantes con PE (Ilhan et al., 2002; Kaur et al., 2008), aunque otros estudios no detectan alteración en dichos niveles (Costa et al., 2013). El hecho de que estos estudios fueran llevados a cabo en grupos poblacionales diferentes, con distinto nivel cultural y patrón nutricional, pone de manifiesto que el daño oxidativo a lípidos presenta una gran variabilidad intrasujeto. En nuestra población, no se detectaron diferencias en los niveles de MDA cuando se comparan las gestaciones con o sin complicaciones fetales. Sin embargo, la prematuridad se ha asociado con niveles elevados de MDA (Parlapani et al., 2017), si bien las diferencias pueden ser atribuidas al hecho de que estos resultados corresponden al último trimestre de la gestación.

El daño oxidativo a proteínas produce grupos carbonilos que alteran la estructura terciaria de las mismas, lo que conlleva en última instancia a la pérdida de su funcionalidad. Nuestros datos no revelan un aumento en los niveles de carbonilos en ninguno de los grupos estudiados. Otros estudios tampoco detectaron diferencias en los niveles de carbonilos en mujeres con PE (Zusterzeel et al., 2001), o bien encontraron niveles elevados de grupos carbonilos al final de la gestación (Serdar et al., 2003). Esto confirma que el momento en el que se determine el daño a proteínas es esencial para analizar la posible implicación de este parámetro en el desarrollo de complicaciones obstétricas. En nuestra población, tampoco detectamos diferencias en el parámetro Prooxy-S, que refleja el daño oxidativo global (daño a lípidos más daño a proteínas), entre gestaciones con o sin complicaciones obstétricas, por lo que deja abierto el planteamiento de si el daño oxidativo es previo o consecuencia de la patología.

Cuando consideramos de manera global los sistemas antioxidantes y pro-oxidantes presentes en el plasma, denominado en esta tesis como índice Global-S, encontramos



que mientras que los embarazos sin complicaciones (maternas y fetales) tienen un valor positivo, indicativo de mayor prevalencia de antioxidantes frente a daño oxidativo, en los embarazos que desarrollaron complicaciones maternas y fetales, el Global-S tiene un valor negativo. Esta diferencia no es significativa en el caso de las complicaciones maternas pero sí lo fue en las complicaciones fetales, especialmente en las gestaciones con CIR. Estos datos ponen de manifiesto que en las complicaciones fetales hay un estrés oxidativo, por lo que éste índice puede ser considerado como un biomarcador predictor de complicaciones fetales, fundamentalmente CIR.

En resumen, aunque al inicio de la gestación, el daño oxidativo a lípidos esté presente en aquellas gestaciones que van a desarrollar complicaciones maternas severas, no hay suficiente evidencia de que el daño oxidativo a lípidos y proteínas pueda ser un indicador por sí mismo de desarrollo de complicaciones obstétricas. El índice Global-S, que tiene en cuenta tanto parámetros antioxidantes como pro-oxidantes, sí aparece modificado en las complicaciones fetales, por lo que puede utilizarse como predictor temprano de complicaciones gestacionales.

### *3.3. Hormonas*

El correcto desarrollo obstétrico requiere de la participación de hormonas; en este trabajo se estudiaron la melatonina y el cortisol.

La melatonina es una hormona que intervienen en múltiples funciones biológicas como la regulación de los periodos sueño-vigilia (Santiago et al., 2001) y también tiene efectos antioxidantes, ejerciendo un efecto citoprotector durante la gestación (Aversa et al., 2012). Hay investigaciones que ponen de manifiesto el papel crucial de esta hormona para un desarrollo gestacional y fetal correctos (Tamura et al., 2008). Los niveles de melatonina detectados en nuestro estudio son inferiores a los descritos por otros autores. La razón de esta diferencia radica en que la melatonina tiene su máximo de secreción en ausencia de luz (Santiago et al., 2001) y nuestras muestras fueron tomadas de forma diurna (entre las 8:00 y las 9:00 am). Además, nuestros datos corresponden al inicio de la gestación, mientras que el resto de estudios muestran niveles de melatonina del último trimestre, siendo conocido que la melatonina va en aumento a lo largo de la gestación, presentando su nivel máximo en los momentos

previos al parto (Kivela, 1991; Tamura et al., 2008). Nuestros resultados reportan que los niveles de melatonina en plasma fueron menores en las gestaciones que desarrollaron complicaciones maternas en comparación con las que no las desarrollaron. De manera similar, otros estudios encuentran menores niveles de melatonina en mujeres con PE que en gestantes que no la desarrollaron (Zeng et al., 2016). Nuestros datos relativos a gestaciones gemelares, en las que hay una mayor prevalencia de complicaciones maternas, señalan que existen una correlación positiva entre los niveles de esta hormona y el peso de los recién nacidos. Dado que las gestaciones gemelares suelen cursar con neonatos de menor peso que en las gestaciones únicas, resulta fundamental que las gestaciones gemelares presenten unos niveles adecuados de melatonina. Algunos ensayos clínicos apoyan que la suplementación con melatonina durante el embarazo podría ser efectiva para reducir las complicaciones gestacionales y fetales (Aversa et al., 2012; Hobson et al., 2013).

En nuestro estudio los niveles de melatonina presentan una gran variabilidad intersujeto. Puesto que en el momento del parto resultan imprescindibles unos niveles adecuados de esta hormona, aquellas gestantes que al inicio de la gestación presenten niveles muy bajos podrían no alcanzar este nivel óptimo, lo que podría estar relacionado con el desarrollo de alguna complicación obstétrica.

El cortisol es una hormona esencial en el organismo que se libera en situaciones de estrés con efecto catabólicos e inmunosupresores. Por lo tanto, en exceso puede influir en el crecimiento fetal. En concreto se ha descrito que, el cortisol disminuye la formación ósea, pudiendo ocasionar problemas en el crecimiento (Chyun et al., 1984). En nuestro estudio se encontró que los niveles de cortisol en la gestante se correlacionan negativamente con el peso del recién nacido. Además, las complicaciones fetales, especialmente la prematuridad, se asocian con mayores niveles de cortisol plasmático. Otros estudios encuentran una asociación entre cortisol materno elevado y mayor prevalencia de abortos espontáneos (Hernández-Martínez et al., 2008). Hay que destacar, que el cortisol determinado en nuestro estudio procede exclusivamente de la madre ya que, el feto comienza a producir cortisol a partir de la semana 28 de gestación (Mastorakos y Ilias, 2003).

Por otro lado, los niveles altos de cortisol se relacionan con el miedo o la ansiedad, situaciones de estrés psicológico (Wingenfeld et al., 2009). En nuestra población de gestantes se observó que los niveles de cortisol fueron más elevados en las gestaciones gemelares y con TRA, en las que también se detectaron puntuaciones más elevadas en la escala de ansiedad. Por lo tanto, sugerimos que, incluso en una gestación saludable, un estado emocional negativo puede influir sobre el resultado obstétrico y que estos efectos pueden estar mediados por el cortisol. Una posible explicación a la relación entre el estrés materno y sus repercusiones biológicas es la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal y la subsiguiente elevación de corticotropina (CRH) y del cortisol materno. En condiciones fisiológicas, el acceso del cortisol materno al feto está limitado por la enzima placentaria  $11\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa de tipo 2 ( $11\beta$ -HSD2) (Merlot et al., 2008), cuya actividad puede verse afectada por varios factores. Por un lado, un exceso de cortisol puede saturarla y por otro, es conocido que situaciones de desnutrición materna, exposición a tóxicos o una elevación de CRH pueden inducir una reducción en la expresión o la actividad de la enzima. La consecuencia última es un mayor acceso de cortisol al feto. Se ha constatado que la inhibición de la  $11\beta$ -HSD2 como consecuencia del estrés materno contribuye a un bajo peso al nacer (Monk, 2001), PE (Oates, 2002) o CIR (Mulder et al., 2002). La relación negativa entre cortisol materno y peso al nacer encontrado en este trabajo, también puede ser explicada por el efecto vasoconstrictor del cortisol sobre la circulación placentaria, lo cual reduciría el aporte sanguíneo al feto y su crecimiento. Ha sido descrito que gestantes que presentan ansiedad tienen una reducción en el flujo de sangre uterino (Littleton et al., 2010).

En resumen, unos niveles adecuados de melatonina resultan imprescindibles para prevenir complicaciones obstétricas durante la gestación. Además, en una gestación gemelar, un nivel insuficiente de melatonina puede contribuir a un bajo peso al nacer. Por otro lado, el exceso de cortisol, que está asociado con estrés psicológico, puede producir efectos negativos sobre el crecimiento fetal. Estos datos son relevantes en el contexto actual de la maternidad, en la que están aumentando las TRA y, como consecuencia, las gestaciones gemelares, que tienen una mayor prevalencia de complicaciones fetales o prematuridad.

### 3.4. Citoquinas

El sistema inmune, a través de las citoquinas, está implicado en la gestación. La influencia de las citoquinas depende del momento gestacional, la edad o incluso la paridad de la gestante, siendo particularmente importante en los procesos de implantación embrionaria (Hoozemans et al., 2004) y durante el parto (Sakamoto et al., 2005). Algunos estudios indican que los niveles elevados de MCP-1 y de TNF- $\alpha$  están asociados con complicaciones obstétricas (Jacobsson et al., 2003; Costa et al., 2013) y proponen a estas citoquinas como marcadores de inflamación. En nuestro estudio, no se encontró variación en los niveles de estas citoquinas en ninguno de los grupos estudiados. Las diferencias pueden ser atribuidas a la distinta etapa de la gestación en la que se han obtenido los datos.

En nuestro estudio sólo se han detectado diferencias en la IL-8 e IL-10 fundamentalmente en complicaciones fetales. Nuestros datos muestran que unos niveles bajos de IL-8 se asocian con PE y con CIR. Puesto que esta citoquina es angiogénica y produce vasodilatación, sugerimos que su deficiencia en etapas tempranas de la gestación, puede conducir a una inadecuada vascularización placentaria y a una mayor resistencia del lecho vascular uterino, que son características de la PE. Además, esto podría reducir el flujo placentario y explicar la asociación entre bajos niveles iniciales de IL-8 y CIR. Esta hipótesis está avalada por el hecho de que los niveles plasmáticos de IL-8 se han encontrado disminuidos en mujeres que tuvieron un aborto espontáneo al inicio de la gestación (Koumantaki et al., 2001). Sin embargo, estudios en etapas finales de la gestación indican que esta citoquina se encuentra elevada en mujeres con PE (Jonsson et al., 2006; Sharma et al., 2007; Costa et al., 2013), lo que podría ser consecuencia de procesos inflamatorios.

Por otro lado, la función esencial de la IL-10 es antiinflamatoria y disminuye la producción de citoquinas pro-inflamatorias. La IL-10 va elevándose a lo largo de la gestación, decayendo en las semanas previas al parto (Reyes-Lagos et al., 2017). Las investigaciones en torno a esta citoquina en la gestación son controvertidas.; mientras que ciertos autores encontraron disminución en los niveles plasmáticos de IL-10 en embarazos con PE (Sharma et al., 2007), otros estudios encuentran un aumento de esta citoquina (Costa et al., 2013) o incluso, no encuentran ninguna asociación entre

los niveles de IL-10 y complicaciones maternas (Reyes-Lagos et al., 2017). Nuestros resultados también son controvertidos. En cuanto a complicaciones maternas, sólo encontramos niveles elevados de IL-10 en mujeres que desarrollaron DMG. Este dato puede parecer sorprendente ya que la DMG se considera una patología inflamatoria. Sin embargo, aún no están claras las alteraciones en el perfil de citoquinas que se expresa a lo largo de la gestación en DMG, y las diferencias en los resultados encontrados en distintos estudios pueden ser atribuidos a la presencia o no de obesidad, que por sí misma es un estado pro-inflamatorio (Gomes et al., 2013).

Por otro lado, en nuestro estudio encontramos bajos niveles de IL-10 en mujeres que desarrollaron complicaciones fetales. Puesto que la IL-10 es antiinflamatoria, este hecho podría explicar el desarrollo de complicaciones fetales como resultado de un proceso inflamatorio temprano. En este sentido, se ha encontrado una deficiencia en IL-10 al inicio de la gestación en relación con la insuficiencia placentaria en embarazos que desarrollan CIR (Raghupathy et al., 2012).

Como se ha comentado anteriormente en este capítulo, nuestros datos revelan una asociación entre el consumo diario de frutas y verduras y mayores niveles tanto de IL-10 como de niveles de antioxidantes plasmáticos. Esto sugiere que el consumo habitual de frutas y verduras podría incrementar los niveles de IL-10, probablemente a través de mecanismos relacionados con los sistemas antioxidantes. Se ha encontrado que varios compuestos fenólicos reducen la liberación de citoquinas pro-inflamatorias de linfocitos T y se ha sugerido que polifenoles derivados de alimentos como cebollas, uvas o té verde, entre otros, pueden reducir los niveles de mediadores pro-inflamatorios en individuos con riesgo de inflamación crónica (Ford et al., 2016).

En resumen, de todas las citoquinas evaluadas, la IL-8 y la IL-10 podrían ser exploradas como potenciales biomarcadores tempranos del desarrollo de complicaciones fetales. Así mismo, nuestro estudio avala la importancia de la dieta para modular procesos pro-inflamatorios y debería ser tomada en consideración en el contexto de la gestación.

#### 4. Evolución de los aspectos psicológicos implicados en la gestación

Ya se ha mencionado que el peso de los neonatos es una variable esencial en la clínica, no sólo porque aumenta la morbilidad infantil (los niños con bajo peso al nacer presentan un riesgo de mortalidad 14 veces mayor durante el primer año de vida; (Peraza Roque et al., 2001)), sino porque estos niños presentan múltiples problemas posteriores, que afectan a su salud en la edad adulta. Se han descrito algunos factores maternos que predisponen al bajo peso de los recién nacidos como, los hábitos tabáquicos (Prendes Labrada et al., 2001) o las gestaciones múltiples (Jahanfar et al., 2017).

El componente psicológico podría también contribuir a las alteraciones en el crecimiento fetal, como demuestra el hecho de que mujeres que han sufrido maltrato durante la gestación tiene hijos de menor peso al nacer (Núñez-Rivas et al., 2003). Nuestros datos revelan que preocupaciones maternas que pueden ser frecuentes en el contexto actual de la maternidad, como por ejemplo los problema de conciliación la vida laboral y personal o las derivadas de la incertidumbre de quedarse embarazada y uso de TRA, se asocian con bajo peso. Nuestro estudio también demuestra que el estrés derivado de la necesidad de TRA y los embarazos gemelares se asociaron con puntuaciones más elevadas de afectividad negativa. Esta escala parece ser importante en poner de manifiesto situaciones psicológicas que cursen con bajo peso al nacer, ya que se encontró una correlación negativa con el peso de los neonatos. Los aspectos psicológicos no sólo participan en la modulación del crecimiento fetal, sino que también contribuir al desarrollo de complicaciones fetales, como demuestra el hecho de que problemas de conflicto en la conciliación trabajo-familia se asociaron con el desarrollo de complicaciones fetales.

Se conoce que, los estímulos emocionales activan cambios neuronales y hormonales y que el estrés inhibe la respuesta inmunitaria (Sánchez et al., 2008). Nuestro estudio demuestra que los niveles elevados de cortisol se asocian con el desarrollo de complicaciones fetales y con gestaciones gemelares y derivadas de TRA, que a su vez tienen mayores puntuaciones de afectividad negativa. Por ello, sugerimos que el cortisol es uno de los elementos centrales en la asociación entre el estrés psicológico y

un peor resultado obstétrico. Es conocido que el cortisol está implicado en el desarrollo fetal, ya que una elevación crónica del cortisol de la gestante inhibe la enzima 11 $\beta$ -HSD2 placentaria, permitiendo el acceso del cortisol a la circulación fetal e interfiriendo con la organogénesis (Glover et al., 2010).

Por otro lado, datos de este trabajo ponen de relieve que procesos psicológicos como la ansiedad, la depresión o la imposibilidad de conciliación del ámbito laboral y personal se relacionan con un aumento de leucocitos. Estudios previos demuestran que el estrés psicosocial y emocional afectan exacerbando la respuesta inmune (Hall et al., 2014) y que el estrés es capaz de inducir, a corto plazo, cambios en la proporción de leucocitos (Viswanathan y Dhabhar, 2005). Recientemente se ha puesto de manifiesto que el estrés crónico puede alterar el perfil leucocitario (Jiang et al., 2017) y que la placentación está influida por factores inmunitarios que contribuyen a la tolerancia inmunitaria hacia el feto (Taylor et al., 2016). Nuestros datos ponen de manifiesto que el estado psicológico materno puede afectar al desarrollo de una complicación fetal a través de una modulación del sistema inmunitario. También sugerimos que estados emocionales negativos y mayores puntuaciones en la escala de depresión, que pueden ser consecuencia de la necesidad de usar TRA, pueden estar relacionados con la mayor prevalencia de abortos espontáneos (Khong et al., 1986; Nepomnaschy et al., 2006) a través de la modulación del sistema inmunitario.

Aunque existen pocos estudios que evalúen la influencia de la "*positividad*" como variable psicológica que previene el riesgo de complicaciones en la salud, algunos de ellos determinan que los sentimientos de felicidad y preocupación se van alternando durante la gestación, incluso aunque se ratifique que el embarazo es saludable (Lou et al., 2017). Frente a las emociones negativas hay una alternativa psicológica como es la disposición optimista que se tenga para afrontar los problemas cotidianos. Nuestros datos demuestran una correlación positiva entre las escalas de afectividad positiva y el peso de los recién nacidos. Estos resultados están en concordancia con lo encontrado en modelos controlados por la edad gestacional, en los que las mujeres con mayores puntuaciones en escalas de optimismo durante la gestación presentaron menor incidencia de neonatos de bajo peso (Lobel et al., 2000). Por otro lado, la conducta optimista se ha relacionado con estilos de vida más saludables (Lobel et al., 2000).

Nuestros datos reflejan que las puntuaciones en la escala de optimismo correlacionaron de forma positiva con los niveles plasmáticos de compuestos fenólicos (antioxidantes que proceden en su mayoría del consumo de frutas y verduras) y de melatonina (antioxidante relacionado con un mejor descanso); en este sentido, las mujeres que tenían una actitud vital más positiva descansaban mejor, tenían una dieta más saludable y esto se refleja en un mejor resultado obstétrico.

Sugerimos que sería interesante realizar una intervención cognitivo-conductual hacia una percepción psicológica positiva en aquellas mujeres que al inicio de la gestación tengan puntuaciones elevadas en escalas emocionales negativas, teniendo en especial consideración las gestaciones TRA, ya que son una población vulnerable desde el punto de vista psicológico. Sería necesaria una investigación más amplia, centrada en identificar otras variables psicosociales y de estilo de vida, que puedan influir en los resultados obstétricos.

Nuestros datos sugieren que un mayor nivel estrés psicológico derivado de situaciones como los embarazo de alto riesgo, el uso de TRA o los conflictos trabajo-familia pueden influir de manera negativa en el peso al nacer a través de la modificación de parámetros biológicos como el cortisol y el perfil inflamatorio de la gestante. Una intervención cognitivo-conductual orientada a potenciar las emociones positivas podría mejorar los resultados obstétricos.



*Conclusiones*

*Conclusions*

## Conclusiones

### Aspectos sociales de la maternidad actual

- El incremento en la edad de maternidad -relacionado con los cambios sociales- conlleva problemas de infertilidad y mayor uso de técnicas de reproducción asistida.
- El consumo de tabaco y alcohol durante la gestación sigue siendo elevado, por lo que son necesarias políticas de salud pública para una mayor concienciación.
- La población de estudio, con elevado nivel socioeconómico, mantiene un patrón nutricional adecuado durante la gestación.
- La suplementación con polivitamínicos durante la gestación está muy extendida, lo que hace necesario la realización de estudios epidemiológicos que evalúen su impacto sobre la salud gestacional.

### Aspectos clínico-obstétricos

- El incremento en la edad de maternidad es un factor determinante para desarrollar complicaciones materno-fetales.
- Las gestaciones gemelares son un factor de riesgo para el desarrollo de complicaciones fetales y bajo peso al nacer.
- La asociación entre el uso de técnicas de reproducción asistida y el desarrollo de complicaciones materno-fetales se explica por el aumento en la edad de maternidad y las gestaciones múltiples.

### Biomarcadores plasmáticos de complicaciones materno-fetales

- Pueden ser de utilidad para predecir el desarrollo de una complicación gestacional:
  - Los niveles de triglicéridos y ácido úrico.
  - Los índices del estado oxidativo (*Antiox-S* y *Global-S*).
  - Los niveles de melatonina y cortisol.
  - Los niveles de IL-8 e IL-10.
- Una dieta rica en frutas y verduras puede contribuir a mejorar el estado antioxidante materno.

**Influencia de factores psicológicos sobre los parámetros biológicos y clínico-obstétricos**

- La afectividad negativa y un estado más depresivo pueden ser consecuencia del uso de técnicas de reproducción asistida.
- El uso de técnicas de reproducción asistida y una pobre conciliación de la vida laboral y familiar pueden explicar, al menos en parte, un bajo peso al nacer.
- Las emociones negativas pueden contribuir a un bajo peso al nacer y a un parto prematuro, probablemente modificando los niveles de cortisol y leucocitos de la gestante.

**Conclusión global**

Existen biomarcadores plasmáticos que pueden ayudar a predecir el desarrollo de una complicación obstétrica. Dichas complicaciones son moduladas por los cambios psicológicos asociados al patrón actual de maternidad.

**Limitaciones del estudio y perspectivas futuras**

- Debido a la baja prevalencia de alguna de las complicaciones obstétricas estudiadas, el tamaño muestral ha sido insuficiente en algunos grupos, lo que no ha permitido detectar diferencias significativas. Por tanto, sería deseable ampliar el grupo poblacional.
- La población de estudio fue muy homogénea desde el punto sociocultural. Sería interesante analizar distintos grupos poblacionales para corroborar el valor predictivo de los biomarcadores propuestos.

## Conclusions

### Social aspects of maternity

- The increase in the age of maternity -related to social changes- leads to problems of infertility and a rise in the use of assisted reproduction techniques.
- The smoking and alcohol consumption during pregnancy is still high; therefore, public health policies are necessary to increase awareness.
- The studied population, with a high socioeconomic level, maintains an adequate nutritional pattern during pregnancy.
- Multivitamin supplementation during pregnancy is widespread, which makes it necessary to carry out epidemiological studies to assess their impact on gestational health.

### Clinical and obstetric aspects

- The increase in age of maternity is a determining factor in the development of maternal and fetal complications.
- Twin gestations are a risk factor for the development of fetal complications and low birth weight.
- The association between the use of assisted reproduction techniques and the development of maternal and fetal complications is explained by the increase in the age of maternity and multiple gestations.

### Plasma biomarkers of maternal-fetal complications

- The following plasma biomarkers have emerged as possible candidates to predict the development of a gestational complication:
  - Triglyceride and uric acid levels.
  - Oxidative status index (*Antiox-S* and *Global-S*).
  - Melatonin and cortisol levels.
  - IL-8 and IL-10 levels.
- A diet rich in fruits and vegetables can help improve the maternal antioxidant status.

**Influence of psychological factors on biological and clinical and obstetric parameters**

- The use of assisted reproduction techniques may exert an influence on negative affectivity and a depressive state.
- The use of assisted reproduction techniques and a poor conciliation of work and family life can explain, at least in part, a low birth weight.
- Negative emotions could contribute to low birth weight and premature birth, probably by modifying the pregnant woman's cortisol and leukocyte levels.

**Global conclusion**

There are plasma biomarkers that can help predicting the development of an obstetric complication. These complications are modulated by the psychological factors associated with the current pattern of maternity.

**Limitations of the study and future perspectives**

- Due to the low prevalence of some of the obstetric complications studied, the sample size has been insufficient in some groups; making enable to detect significant differences. Therefore, it would be desirable to expand the population group.
- The studied population was very homogeneous from the sociocultural point of view. It would be interesting to analyze population of different social background to corroborate the predictive value of the proposed biomarkers.

# *Bibliografía*

- A Quera Salva, M., Hartley, S., Barbot, F., C Alvarez, J., Lofaso, F., and Guilleminault, C. (2011). Circadian rhythms, melatonin and depression. *Curr Pharm Des.* 17, 1459-1470.
- Al-Gubory, K. H. (2014). Environmental pollutants and lifestyle factors induce oxidative stress and poor prenatal development. *Reprod BioMed Online.* 29, 17-31.
- Al-Gubory, K. H. (2016). 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.* 108, 351-364.
- Alonso Ojembarrena, A., Cano Fernandez, J., Giron Velasco, A., Yep Chullen, G., and Sanchez Bayle, M. (2005). Birth weight and familial smoking. *An Pediatr. (Barc)* 63, 116-119.
- Antequera Jurado, R., Moreno-Rosset, C., Jenaro Río, C., and Ávila Espada, A. (2008). Principales trastornos psicológicos asociados a la infertilidad. *Papeles del psicólogo.* 29 (2).
- Aversa, S., Pellegrino, S., Barberi, I., Reiter, R. J., and Gitto, E. (2012). Potential utility of melatonin as an antioxidant during pregnancy and in the perinatal period. *J Maten Fetal Neonatal Med.* 25, 207-221.
- Balasundram, N., Sundram, K., and Samman, S. (2006). Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191-203.
- Ballescá, J., Matorras, R., Viscasillas, P., Peinado, J., Romeu, A., Coroleu, B., et al. (2002). Registro de inseminaciones (IAC-IAD). *Sociedad española de fertilidad.* 19, 41-47.
- Barneo-Caragol, C., Martínez-Morillo, E., Rodríguez-González, S., Lequerica-Fernández, P., Vega-Naredo, I., and Menéndez, F. V. Á. (2018). Strontium and oxidative stress in normal pregnancy. *J Trace Elem Med Biol.* 45, 57-63.
- Bartels, Ä., Egan, N., Broadhurst, D., Khashan, A., Joyce, C., Stapleton, M., et al. (2013). Maternal serum cholesterol levels are elevated from the 1st trimester of pregnancy: a cross-sectional study. *J Obstet Gynaecol.* 23, 747-752.

- Bartha, J. L., Romero-Carmona, R., and Comino-Delgado, R. (2003). Inflammatory cytokines in intrauterine growth retardation. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 82, 1099-1102.
- Basso, O., and Wilcox, A. (2010). Mortality risk among preterm babies: immaturity versus underlying pathology. *Epidemiology* 21, 521-527.
- Bernardi, F., Guolo, F., Bortolin, T., Petronilho, F., and Dal-Pizzol, F. (2008). Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia. *J Obstet Gynaecol Res.* 34, 948-951.
- Bernis, C., Varea, C., and Terán, J. (2016). Ciclo vital, transformación ambiental y las estrategias de la Historia de vida. *Antropo.* 36.
- Bernstein, I. M., Horbar, J. D., Badger, G. J., Ohlsson, A., and Golan, A. (2000). Morbidity and mortality among very-low-birth-weight neonates with intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol.* 182, 198-206.
- Bréart, G., Barros, H., Wagener, Y., and Prati, S. (2003). Characteristics of the childbearing population in Europe. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 111, S45-S52.
- Burd, L., Roberts, D., Olson, M., and Odendaal, H. (2007). Ethanol and the placenta: a review. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 20, 361-375.
- Cabañas, F., López-Azorín, M., and Pellicer, A. (2009). Impacto de las técnicas de reproducción asistida en la salud del recién nacido. *An Pediatr (Barc).* 70, 319-322.
- Cabañero Martínez, M., Richart Martínez, M., Cabrero García, J., Orts Cortés, M., Reig Ferrer, A., and Tosal Herrero, B. (2004). Fiabilidad y validez de la Escala de Satisfacción con la Vida de Diener en una muestra de mujeres embarazadas y puérperas. *Psicothema* 16 (3).
- Camps, J., and García-Heredia, A. (2014). "Introduction: oxidation and inflammation, a molecular link between non-communicable diseases," in *Oxidative Stress and Inflammation in Non-communicable Diseases-Molecular Mechanisms and Perspectives in Therapeutics* Anonymous: Springer, 1-4.



- Carson, G., Cox, L. V., Crane, J., Croteau, P., Graves, L., Kluka, S., et al. (2010). Alcohol use and pregnancy consensus clinical guidelines. *J Obstet Gynaecol Can.* 32, S1-31.
- Centers of Disease Control and Prevention. Tobacco use and pregnancy.
- Charles, D. H., Ness, A. R., Campbell, D., Smith, G. D., Whitley, E., and Hall, M. H. (2005). Folic acid supplements in pregnancy and birth outcome: re-analysis of a large randomised controlled trial and update of Cochrane review. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 19, 112-124.
- Chelchowska, M., Ambroszkiewicz, J., Gajewska, J., Laskowska-Klita, T., and Leibschang, J. (2011). The effect of tobacco smoking during pregnancy on plasma oxidant and antioxidant status in mother and newborn. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 155, 132-136.
- Chen, Y., Sheen, J., Tiao, M., Tain, Y., and Huang, L. (2013). Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies. *Int J Mol Sci.* 14, 5380-5401.
- Chyun, Y. S., Kream, B. E., and Raisz, L. G. (1984). Cortisol decreases bone formation by inhibiting periosteal cell proliferation. *Endocrinology.* 114, 477-480.
- Condezo-Hoyos, L., Rubio, M., Arribas, S. M., España-Caparrós, G., Rodríguez-Rodríguez, P., Mujica-Pacheco, E., et al. (2013). A plasma oxidative stress global index in early stages of chronic venous insufficiency. *J Vasc Surg.* 57, 205-213.
- Costa, S., Marreiro, D. d. N., Moita Neto, J. M., Brito, J. A., Neta, Eunice Alves da Silva, Matias, J. P., et al. (2013). Oxidative stress and immunological alteration in women with preeclampsia. *Hypertens Pregnancy.* 32, 304-311.
- Dain, L., Auslander, R., and Dirnfeld, M. (2011). The effect of paternal age on assisted reproduction outcome. *Fertil Steril.* 95, 1-8.
- de la Calle Fernández-Miranda, M., Bertriu, M. C., Rodríguez-González, R., Magdaleno-Dans, F., Teres, F. O., and González, A. G. (2012). Gestación gemelar con muerte intraútero de uno de los fetos: pronóstico materno y neonatal del feto superviviente. *Comparaison des techniques de mesure par ul-trasons de ligne col de l'utérus et de l'endomètre en utilisant deux.* 254.

- Diener, E., Emmons, R. A., Larsen, R. J., and Griffin, S. (1985). The satisfaction with life scale. *J Pers Assess.* 49, 71-75.
- Djordjevic, A., Spasic, S., Jovanovic-Galovic, A., Djordjevic, R., and Grubor-Lajsic, G. (2004). Oxidative stress in diabetic pregnancy: SOD, CAT and GSH-Px activity and lipid peroxidation products. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 16, 367-372.
- Dole, N., Savitz, D. A., Hertz-Picciotto, I., Siega-Riz, A. M., McMahon, M. J., and Buekens, P. (2003). Maternal stress and preterm birth. *Am J Epidemiol.* 157, 14-24.
- Draper, H., and Hadley, M. (1990). "Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation," in *Methods in enzymology*. Anonymous: Elsevier, 421-431.
- Entringer, S., Kumsta, R., Hellhammer, D. H., Wadhwa, P. D., and Wüst, S. (2009). Prenatal exposure to maternal psychosocial stress and HPA axis regulation in young adults. *Horm Behav.* 55, 292-298.
- Escribano, A., Mérida, L., García, J., and Gaspar, I. (2012). "Tabaco y embarazo: desabituación tabáquica," in *Manual de patología médica y embarazo*, eds. M. García de Lucas, J. de la Torre Lima, M. Martín Escalante, and J. Olalla Sierra (Madrid, España: Editorial Médica Panamericana), 202-206.
- Eurostat. (2015). Estadísticas de empleo.
- Ferrando, P. J., Chico, E., and Tous, J. M. (2002). Propiedades psicométricas del test de optimismo Life Orientation Test. *Psicothema.* 14 (3).
- Ford, C. T., Richardson, S., McArdle, F., Lotito, S. B., Crozier, A., McArdle, A., et al. (2016). Identification of (poly) phenol treatments that modulate the release of pro-inflammatory cytokines by human lymphocytes. *Br J Nutr.* 115, 1699-1710.
- Fujimaki, A., Watanabe, K., Mori, T., Kimura, C., Shinohara, K., and Wakatsuki, A. (2011). Placental oxidative DNA damage and its repair in preeclamptic women with fetal growth restriction. *Placenta.* 32, 367-372.
- Geraghty, A. A., Alberdi, G., O'Sullivan, E. J., O'Brien, E. C., Crosbie, B., Twomey, P. J., et al. (2017). Maternal and fetal blood lipid concentrations during pregnancy

- differ by maternal body mass index: findings from the ROLO study. *BMC Pregnancy Childbirth*. 17, 360.
- Gielchinsky, Y., Bogoch, Y., Rechavi, G., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Shveiky, D., et al. (2008). Gene expression in women conceiving spontaneously over the age of 45 years. *Fertil Steril*. 89, 1641-1650.
- Glover, V., O'connor, T., and O'Donnell, K. (2010). Prenatal stress and the programming of the HPA axis. *Neurosci Biobehav Rev*. 35, 17-22.
- Goldenberg, R. L., Culhane, J. F., Iams, J. D., and Romero, R. (2008). Epidemiology and causes of preterm birth. *Lancet*. 371, 75-84.
- Gomes, C. P., Torloni, M. R., Gueuvoghlian-Silva, B. Y., Alexandre, S. M., Mattar, R., and Daher, S. (2013). Cytokine levels in gestational diabetes mellitus: a systematic review of the literature. *Am J Reprod Immunol*. 69, 545-557.
- Guerra, D. (2010). "Factores psicológicos en el aborto recurrente," in *Manual de intervención psicológica en reproducción asistida. Grupo de Interés de psicología.*, ed. V. Giménez (Barcelona-España: EdikaMed: Sociedad Española de Fertilidad), 148-156.
- Haider, B. A., and Bhutta, Z. A. (2006). Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 4.
- Haider, B. A., and Bhutta, Z. A. (2015). Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database Syst Rev*. 1.
- Hall, J. M., Witter, A. R., Racine, R. R., Berg, R. E., Podawiltz, A., Jones, H., et al. (2014). Chronic psychological stress suppresses contact hypersensitivity: potential roles of dysregulated cell trafficking and decreased IFN- $\gamma$  production. *Brain Behav Immun*. 36, 156-164.
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. (2015). *Free radicals in biology and medicine*: Oxford University Press, USA.
- Halliwell, B. (2013). The antioxidant paradox: less paradoxical now?. *Br J Clin Pharmacol*. 75, 637-644.

- Haram, K., Sjøfteland, E., and Bukowski, R. (2006). Intrauterine growth restriction. *Intern J Gynecol Obst.* 93, 5-12.
- Hawkins, C., Morgan, P., and Davies, M. (2009). Quantification of protein modification by oxidants. *Free Radic Biol Med.* 46, 965-988.
- Hawkins, T., Roberts, J., Mangos, G., Davis, G., Roberts, L., and Brown, M. (2012). Plasma uric acid remains a marker of poor outcome in hypertensive pregnancy: a retrospective cohort study. *BJOG.* 119, 484-492.
- Hernández-Martínez, C., Arija, V., Balaguer, A., Cavallé, P., and Canals, J. (2008). Do the emotional states of pregnant women affect neonatal behaviour?. *Early Hum Dev.* 84, 745-750.
- Hissin, P. J., and Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem.* 74, 214-226.
- Hobson, S. R., Lim, R., Gardiner, E. E., Alers, N. O., and Wallace, E. M. (2013). Phase I pilot clinical trial of antenatal maternally administered melatonin to decrease the level of oxidative stress in human pregnancies affected by pre-eclampsia (PAMPR): study protocol. *BMJ Open* 3.
- Hoozemans, D. A., Schats, R., Lambalk, C. B., Homburg, R., and Hompes, P. G. (2004). Human embryo implantation: current knowledge and clinical implications in assisted reproductive technology. *Reprod Biomed Online.* 9, 692-715.
- Horbar, J. D., Badger, G. J., Carpenter, J. H., Fanaroff, A. A., Kilpatrick, S., LaCorte, M., et al. (2002). Trends in mortality and morbidity for very low birth weight infants, 1991-1999. *Pediatrics.* 110, 143-151.
- Hracsko, Z., Orvos, H., Novak, Z., Pal, A., and Varga, I. (2008). Evaluation of oxidative stress markers in neonates with intra-uterine growth retardation. *Redox Rep.* 13, 11-16.
- Hutcheon, J., Lisonkova, S., Magee, L., Von Dadelszen, P., Woo, H., Liu, S., et al. (2011). Optimal timing of delivery in pregnancies with pre-existing hypertension. *BJOG.* 118, 49-54.

- i Argente, R. S. (2005). *Abordaje práctico de las alteraciones hematológicas en la mujer embarazada y en el neonato*: Acción Médica.
- Ilhan, N., Ilhan, N., and Simsek, M. (2002). The changes of trace elements, malondialdehyde levels and superoxide dismutase activities in pregnancy with or without preeclampsia. *Clin Biochem.* 35, 393-397.
- Instituto Nacional de Estadística. (2016). *Movimiento Natural de la Población e Indicadores Demográficos Básicos*.
- Izzedin-Bouquet de Durán, R. (2011). Psicología de la reproducción: de la infertilidad a la reproducción asistida. *Res Cient Ciencia Méd.* 14, 31-34.
- Jacobsson, B., Holst, R., Wennerholm, U., Andersson, B., Lilja, H., and Hagberg, H. (2003). Monocyte chemotactic protein-1 in cervical and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the amniotic cavity, intra-amniotic inflammation, and preterm delivery. *Am J Obstet Gynecol.* 189, 1161-1167.
- Jahanfar, S., Lim, K., and Ovideo-Joekes, E. (2017). Birth weight discordance and adverse perinatal outcomes. *J Perinat Med.* 45, 603-611.
- Jauniaux, E., Poston, L., and Burton, G. J. (2006). Placental-related diseases of pregnancy: involvement of oxidative stress and implications in human evolution. *Hum Reprod Update* 12, 747-755.
- Jauniaux, E., Watson, A. L., Hempstock, J., Bao, Y., Skepper, J. N., and Burton, G. J. (2000). Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: a possible factor in human early pregnancy failure. *Am J Pathol.* 157, 2111-2122.
- Jiang, W., Li, Y., Sun, J., Li, L., Li, J., Zhang, C., et al. (2017). Spleen contributes to restraint stress induced changes in blood leukocytes distribution. *Sci Rep.* 7, 6501.
- Jonsson, Y., Rubèr, M., Matthiesen, L., Berg, G., Nieminen, K., Sharma, S., et al. (2006). Cytokine mapping of sera from women with preeclampsia and normal pregnancies. *J Reprod Immunol.* 70, 83-91.
- Karacay, O., Sepici-Dincel, A., Karcaaltincaba, D., Sahin, D., Yalvac, S., Akyol, M., et al. (2010). A quantitative evaluation of total antioxidant status and oxidative stress

- markers in preeclampsia and gestational diabetic patients in 24-36 weeks of gestation. *Diabetes Res Clin Pract.* 89, 231-238.
- Karowicz-Bilinska, A., Kędziora-Kornatowska, K., and Bartosz, G. (2007). Indices of oxidative stress in pregnancy with fetal growth restriction. *Free Radic Res.* 41, 870-873.
- Kaur, G., Mishra, S., Sehgal, A., and Prasad, R. (2008). Alterations in lipid peroxidation and antioxidant status in pregnancy with preeclampsia. *Mol Cell Biochem.* 313, 37-44.
- Khong, T., Wolf, F. d., Robertson, W., and Brosens, I. (1986). Inadequate maternal vascular response to placentation in pregnancies complicated by pre-eclampsia and by small-for-gestational age infants. *Br J Obstet Gynaecol.* 93, 1049-1059.
- Kivela, A. (1991). Serum melatonin during human pregnancy. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 124, 233-237.
- Ko, T., Tsai, L., Chu, L., Yeh, S., Leung, C., Chen, C., et al. (2014). Parental smoking during pregnancy and its association with low birth weight, small for gestational age, and preterm birth offspring: a birth cohort study. *Pediatr Neonatol.* 55, 20-27.
- Koumantaki, Y., Matalliotakis, I., Sifakis, S., Kyriakou, D., Neonaki, M., Goymenou, A., et al. (2001). Detection of interleukin-6, interleukin-8, and interleukin-11 in plasma from women with spontaneous abortion. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 98, 66-71.
- Kumar, A., Begum, N., Prasad, S., Agarwal, S., and Sharma, S. (2013). IL-10, TNF- $\alpha$  & IFN- $\gamma$ : potential early biomarkers for preeclampsia. *Cell Immunol.* 283, 70-74.
- Langley-Evans, S. (2001). Fetal programming of cardiovascular function through exposure to maternal undernutrition. *Proc Nutr Soc.* 60, 505-513.
- Lardoeyt Ferrer, R., Taboada Lugo, N., Torres Sánchez, Y., and Viñas Portilla, C. (2005). Fundamentos del ácido fólico en la prevención primaria farmacológica de defectos congénitos. *Res Cub Med Gen Int.* 21, 0-0.

- Lazinski, M. J., Shea, A. K., and Steiner, M. (2008). Effects of maternal prenatal stress on offspring development: a commentary. *Arch Womens Ment Health*. 11, 363-375.
- Leproult, R., Copinschi, G., Buxton, O., and Van Cauter, E. (1997). Sleep loss results in an elevation of cortisol levels the next evening. *Sleep*. 20, 865-870.
- Lezcano, A. C., Longás, A. F., Fernández, D. Y., Villanova, J. G. D., Montejo, A. R., Copil, A. C., et al. (2008). Estudio transversal español de crecimiento 2008. Parte I: valores de peso y longitud en recién nacidos de 26-42 semanas de edad gestacional. *An Pediatr (Bac)*. 68, 544-551.
- Littleton, H. L., Bye, K., Buck, K., and Amacker, A. (2010). Psychosocial stress during pregnancy and perinatal outcomes: a meta-analytic review. *J Psychosom Obstet Gynaecol*. 31, 219-228.
- Llurba, E., Gratacós, E., Martín-Gallán, P., Cabero, L., and Dominguez, C. (2004). A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in preeclampsia and normal pregnancy. *Free Radic Biol Med*. 37, 557-570.
- Lobel, M., DeVincent, C. J., Kaminer, A., and Meyer, B. A. (2000). The impact of prenatal maternal stress and optimistic disposition on birth outcomes in medically high-risk women. *Health Psychol*. 19, 544-553.
- López-Roig, S., Terol, M., Pastor, M., Neipp, M., Massutí, B., Rodríguez-Marín, J., et al. (2000). Ansiedad y depresión. Validación de la escala HAD en pacientes oncológicos. *Res Psicol Salud*. 12, 127-155.
- Lou, S., Frumer, M., Schlütter, M. M., Petersen, O. B., Vogel, I., and Nielsen, C. P. (2017). Experiences and expectations in the first trimester of pregnancy: a qualitative study. *Health Expect*. 20, 1320-1329.
- Luk, J., Greenfeld, D. A., and Seli, E. (2010). Third party reproduction and the aging couple. *Maturitas*. 66, 389-396.
- Lumey, L. H. (1992). Decreased birthweights in infants after maternal in utero exposure to the Dutch famine of 1944–1945. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 6, 240-253.

- Manau, D., and Martínez, F. (2012). "Nutrición y fertilidad," in *Estilo de vida y fertilidad*, eds. M. Checa, D. Manau, and F. Martínez (Madrid-España: Editorial Médica Panamericana), 143-156.
- Martinez-Frias, M. L., Rodriguez-Pinilla, E., Bermejo, E., and Grupo Periferico del ECEMC. (2005). Tobacco smoking during pregnancy in Spain: an analysis according to years, autonomous communities and maternal characteristics. *Med Clin (Barc)* 124, 86-92.
- Mastorakos, G., and Ilias, I. (2003). Maternal and fetal hypothalamic-pituitary-adrenal axes during pregnancy and postpartum. *Ann N Y Acad Sci.* 997, 136-149.
- Mendoza Ladrón de Guevara, N., Salamanca Ballesteros, A., and Lobo Abascal, P. (2012). "Factores socioculturales y reproducción," in *Estilo de vida y fertilidad*, eds. M. Á. Checa Vizcaíno, D. Manau Trullás, and F. Martínez San Andrés (Madrid, España: Editorial Médica Panamericana), 1-11.
- Merlot, E., Couret, D., and Otten, W. (2008). Prenatal stress, fetal imprinting and immunity. *Brain Behav Immun.* 22, 42-51.
- Ministerio de Sanidad y Consumo. Dirección de Salud Pública. (2001). Recomendaciones sobre suplementación con ácido fólico para la prevención de los defectos del tubo neural. 25.
- Monk, C. (2001). Stress and mood disorders during pregnancy: implications for child development. *Psychiatr Q.* 72, 347-357.
- Moreno, A., Díaz, D. G., and Barcelona, I. (2007). Procesos emocionales en pacientes sometidos a técnicas de reproducción asistida. *Guías de evaluación, consejo, apoyo e intervención psicológica en reproducción asistida.* 11.
- Moriondo, M., De Palma, P., Medrano, L. A., and Murillo, P. (2012). Adaptación de la Escala de Afectividad Positiva y Negativa (PANAS) a la población de adultos de la ciudad de Córdoba: análisis psicométricos preliminares. *Universitas Psychologica.* 11 (1).
- Morton, J. S., Cooke, C. L., and Davidge, S. T. (2016). In Utero Origins of Hypertension: Mechanisms and Targets for Therapy. *Physiol Rev.* 96, 549-603.



- Mulder, E. J., De Medina, P. R., Huizink, A. C., Van den Bergh, Bea RH, Buitelaar, J. K., and Visser, G. H. (2002). Prenatal maternal stress: effects on pregnancy and the (unborn) child. *Early Hum Dev.* 70, 3-14.
- Mundim, G. J., Paschoini, M. C., Júnior, E. A., Costa, F. D. S., and Júnior, V. R. (2016). Assessment of angiogenesis modulators in pregnant women with pre-eclampsia: a case-control study. *Arch Gynecol Obstet.* 293, 369-375.
- Nelen, W. L., Blom, H. J., Steegers, E. A., Den Heijer, M., Thomas, C. M., and Eskes, T. K. (2000). Homocysteine and folate levels as risk factors for recurrent early pregnancy loss. *Obstet Gynecol.* 95, 519-524.
- Nepomnaschy, P. A., Welch, K. B., McConnell, D. S., Low, B. S., Strassmann, B. I., and England, B. G. (2006). Cortisol levels and very early pregnancy loss in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103, 3938-3942.
- Núñez-Rivas, H. P., Monge-Rojas, R., Gríos-Dávila, C., Elizondo-Ureña, A. M., and Rojas-Chavarría, A. (2003). La violencia física, psicológica, emocional y sexual durante el embarazo: riesgo reproductivo predictor de bajo peso al nacer en Costa Rica. *Res Panamericana de Salud Pública.* 14, 75-83.
- Nykjaer, C., Alwan, N. A., Greenwood, D. C., Simpson, N. A., Hay, A. W., White, K. L., et al. (2014). Maternal alcohol intake prior to and during pregnancy and risk of adverse birth outcomes: evidence from a British cohort. *J Epidemiol Community Health.* 68, 542-549.
- Oates, M. R. (2002). Adverse effects of maternal antenatal anxiety on children: causal effect or developmental continuum?. *Br J Psychiatry.* 180, 478-479.
- O'Donnell, K., O'Connor, T. G., and Glover, V. (2009). Prenatal stress and neurodevelopment of the child: focus on the HPA axis and role of the placenta. *Dev Neurosci.* 31, 285-292.
- O'Donnell, K. J., Bugge Jensen, A., Freeman, L., Khalife, N., O'Connor, T. G., and Glover, V. (2012). Maternal prenatal anxiety and downregulation of placental 11beta-HSD2. *Psychoneuroendocrinology.* 37, 818-826.

- Ombelet, W., Cooke, I., Dyer, S., Serour, G., and Devroey, P. (2008). Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries. *Hum Reprod Update*. 14, 605-621.
- Orhan, H., Önderoglu, L., Yücel, A., and Sahin, G. (2003). Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies. *Arch Gynecol Obstet*. 267, 189-195.
- Ortuno-Sahagun, D., Pallas, M., and Rojas-Mayorquin, A. E. (2014). Oxidative stress in aging: advances in proteomic approaches. *Oxid Med Cell Longev* 2014, 573208.
- Parazzini, F., Chatenoud, L., Surace, M., Tozzi, L., Salerio, B., Bettoni, G., et al. (2003). Moderate alcohol drinking and risk of preterm birth. *Eur J Clin Nutr*. 57, 1345.
- Parlapani, E., Agakidis, C., Karagiozoglou-Lampoudi, T., Sarafidis, K., Agakidou, E., Athanasiadis, A., et al. (2017). The Mediterranean diet adherence by pregnant women delivering prematurely: association with size at birth and complications of prematurity. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 13, 1-8.
- Peng, L., and Huiguo, D. (2016). Committee on gynecologic practice of the American College of Obstetricians and Gynecologists: hepatitis B, hepatitis C, and human immunodeficiency virus infections in obstetrician-gynecologists. *Linchuang Gandanbing Zazhi*. 32, 1250-1252.
- Peraza Roque, G. J., Pérez Delgado, Silvia de la C, and Figueroa Barreto, Zoe de los A. (2001). Factores asociados al bajo peso al nacer. *Res Cub Med Genel Int*. 17, 490-496.
- Pinto-Dussán, M. C., Aguilar-Mejía, O. M., and Gómez-Rojas, J. D. (2010). Estrés psicológico materno como posible factor de riesgo prenatal para el desarrollo de dificultades cognoscitivas: caracterización neuropsicológica de una muestra colombiana. *Universitas Psychologica*. 9 (3).
- Posada Estrada, G., Campo Campo, M. N., Betancur, L., and Jaramillo, D. (2012). Factores de riesgo para Diabetes Gestacional en población obstétrica. *Res Colom Obst Ginecol*. 63 (2).

- Prendes Labrada, M. C., Jiménez Alemán, G. M., González Pérez, R., and Guibert Reyes, W. (2001). Estado nutricional materno y peso al nacer. *Res Cub Med Genel Int.* 17, 35-42.
- Qiu, X., Gao, F., Qiu, Y., Bao, J., Gu, X., Long, Y., et al. (2017). Association of maternal serum homocysteine concentration levels in late stage of pregnancy with preterm births: a nested case-control study. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 11, 1-5.
- Raghupathy, R., Al-Azemi, M., and Azizieh, F. (2012). Intrauterine growth restriction: cytokine profiles of trophoblast antigen-stimulated maternal lymphocytes. *Clin Dev Immunol.* 2012, 734865.
- Rebollar, E., Ávila, J., and Gutiérrez, V. (2010). Factores de riesgo asociados al bajo peso al nacer. *Investig Materno Infant.* 2, 117-122.
- Reiter, R. J. (1998). Melatonin and human reproduction. *Ann Med.* 30, 103-108.
- Reiter, R. J., Tan, D. X., Osuna, C., and Gitto, E. (2000). Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci.* 7, 444-458.
- Reyes-Lagos, J. J., Pena-Castillo, M. A., Echeverria, J. C., Perez-Sanchez, G., Alvarez-Herrera, S., Becerril-Villanueva, E., et al. (2017). Women Serum Concentrations of the IL-10 Family of Cytokines and IFN-gamma Decrease from the Third Trimester of Pregnancy to Active Labor. *Neuroimmunomodulation.* 24, 162-170.
- Robson, P., Blannin, A., Walsh, N., Castell, L., and Gleeson, M. (1999). Effects of exercise intensity, duration and recovery on in vitro neutrophil function in male athletes. *Int J Sports Med.* 20, 128-130.
- Rodríguez, M., Pereyra, M. G., Gil, E., Jofré, M., De Bortoli, M., and Labiano, L. M. (2009). Propiedades psicométricas de la escala de resiliencia versión argentina. *Revista Evaluar.* 9.
- Rodríguez-Rodríguez, P., de Pablo, Angel Luis López, Condezo-Hoyos, L., Martín-Cabrejas, M. A., Aguilera, Y., Ruiz-Hurtado, G., et al. (2015). Fetal undernutrition is associated with perinatal sex-dependent alterations in oxidative status. *J Nutr Biochem.* 26, 1650-1659.

- Ruiz-Hurtado, G., Condezo-Hoyos, L., Pulido-Olmo, H., Aranguéz, I., del Carmen González, M., Arribas, S., et al. (2014). Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression. *J Hypertens.* 32, 0-0.
- Sakamoto, Y., Moran, P., Bulmer, J. N., Searle, R. F., and Robson, S. C. (2005). Macrophages and not granulocytes are involved in cervical ripening. *J Reprod Immunol.* 66, 161-173.
- Saker, M., Mokhtari, N. S., Merzouk, S. A., Merzouk, H., Belarbi, B., and Narce, M. (2008). Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 141, 95-99.
- Saleh, L., and Plieth, C. (2010). Total low-molecular-weight antioxidants as a summary parameter, quantified in biological samples by a chemiluminescence inhibition assay. *Nat Protoc.* 5, 1627-1634.
- Sánchez, P. T., Sirera, R., Peiró, G., and Palmero, F. (2008). Estrés, depresión, inflamación y dolor. *REME.* 11, 1-15.
- Sanci, M., Töz, E., Ince, O., Özcan, A., Polater, K., Inan, A. H., et al. (2017). Reference values for maternal total and differential leukocyte counts in different trimesters of pregnancy and the initial postpartum period in western Turkey. *J Obstet Gynaecol.* 37, 571-575.
- Santiago, J. R., Nollado, M. S., Kinzler, W., and Santiago, T. V. (2001). Sleep and sleep disorders in pregnancy. *Ann Intern Med.* 134, 396-408.
- Sautin, Y. Y., and Johnson, R. J. (2008). Uric acid: the oxidant-antioxidant paradox. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids.* 27, 608-619.
- Scheier, M. F., Carver, C. S., and Bridges, M. W. (1994). Distinguishing optimism from neuroticism (and trait anxiety, self-mastery, and self-esteem): a reevaluation of the Life Orientation Test. *J Pers Soc Psychol.* 67, 1063-1078.
- Schoenaker, D. A., Soedamah-Muthu, S. S., Callaway, L. K., and Mishra, G. D. (2015). Prepregnancy dietary patterns and risk of developing hypertensive disorders of

- pregnancy: results from the Australian Longitudinal Study on Women's Health. *Am J Clin Nutr.* 102, 94-101.
- Serdar, Z., Gür, E., Çolakođullarý, M., Develiođlu, O., and Sarandöl, E. (2003). Lipid and protein oxidation and antioxidant function in women with mild and severe preeclampsia. *Arch Gynecol Obstet.* 268, 19-25.
- Sharma, A., Satyam, A., and Sharma, J. B. (2007). Leptin, IL-10 and Inflammatory Markers (TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8) in Pre-Eclamptic, Normotensive Pregnant and Healthy Non-Pregnant Women. *Am J Reprod Immunol.* 58, 21-30.
- Siljee, J. E., Wortelboer, E. J., Koster, M. P., Imholz, S., Rodenburg, W., Visser, G. H., et al. (2013). Identification of interleukin-1 beta, but no other inflammatory proteins, as an early onset pre-eclampsia biomarker in first trimester serum by bead-based multiplexed immunoassays. *Prenat Diagn.* 33, 1183-1188.
- Simon, L., Pastor-Barriuso, R., Boldo, E., Fernandez-Cuenca, R., Ortiz, C., Linares, C., et al. (2017). Smoke-Free Legislation in Spain and Prematurity. *Pediatrics.* 139, 2016-2068.
- Simonetti, G. D., Schwertz, R., Klett, M., Hoffmann, G. F., Schaefer, F., and Wuhl, E. (2011). Determinants of blood pressure in preschool children: the role of parental smoking. *Circulation.* 123, 292-298.
- Sistema Nacional de Salud. (2014). Encuesta Nacional de Salud. *Ministerio de Sanidad y Consumo* (España).
- Spong, C. Y., Sherer, D. M., Ghidini, A., Pezzullo, J. C., Salafia, C. M., and Eglinton, G. S. (1997). Midtrimester Amniotic Fluid Tumor Necrosis Factor-Alpha Does Not Predict Small-for-Gestational-Age Infants. *American J Reprod Immunol.* 37, 236-239.
- STATISTICS, A. B. O. (2007). year book Australia.
- Stohl, H. E., Lee, R. H., Manetta, J., Kikly, K., Korst, L. M., and Stohl, W. (2017). Maternal Serum B-Cell Activating Factor Levels: Candidate Early Biomarker for Hypertensive Disorders of Pregnancy. *Hypertension.* 70, 1007-1013.

- Szarka, A., Rigó, J., Lázár, L., Bekő, G., and Molvarec, A. (2010). Circulating cytokines, chemokines and adhesion molecules in normal pregnancy and preeclampsia determined by multiplex suspension array. *BMC Immunol.* 11, 59.
- Takasaki, A., Tamura, H., Miwa, I., Taketani, T., Shimamura, K., and Sugino, N. (2010). Endometrial growth and uterine blood flow: a pilot study for improving endometrial thickness in the patients with a thin endometrium. *Fertil Steril.* 93, 1851-1858.
- Talge, N. M., Neal, C., and Glover, V. (2007). Antenatal maternal stress and long-term effects on child neurodevelopment: how and why?. *J Child Psychol Psychiatry.* 48, 245-261.
- Tamura, H., Nakamura, Y., Terron, M. P., Flores, L. J., Manchester, L. C., Tan, D., et al. (2008). Melatonin and pregnancy in the human. *Reproductive Toxicology.* 25, 291-303.
- Taylor, B. D., Ness, R. B., Klebanoff, M. A., Zoh, R., Bass, D., Hougaard, D. M., et al. (2016). First and second trimester immune biomarkers in preeclamptic and normotensive women. *Pregnancy Hypertens.* 6, 388-393.
- Torabian, S., Haddad, E., Rajaram, S., Banta, J., and Sabate, J. (2009). Acute effect of nut consumption on plasma total polyphenols, antioxidant capacity and lipid peroxidation. *J Hum Nutr Diet.* 22, 64-71.
- Valdés, M., and García-Esteve, L. (2017). "Estrés prenatal materno," in *Manual de psiquiatría perinatal*, eds. L. García-Esteve, and M. Valdés (Madrid-España: Editorial Médica Panamericana), 43-55.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M., and Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39, 44-84.
- Veglia, F., Cavalca, V., and Tremoli, E. (2010). "OXY-SCORE: a global index to improve evaluation of oxidative stress by combining pro-and antioxidant markers," in *Advanced Protocols in Oxidative Stress*. Anonymous:Springer, 197-213.

- Ventura, S. J., Abma, J. C., Mosher, W. D., and Henshaw, S. K. (2009). Estimated pregnancy rates for the United States, 1990-2005: an update. *Natl Vital Stat Rep.* 58, 1-14.
- Viswanathan, K., and Dhabhar, F. S. (2005). Stress-induced enhancement of leukocyte trafficking into sites of surgery or immune activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102, 5808-5813.
- Wagnild, G. M., and Young, H. M. (1993). Development and psychometric evaluation of the Resilience Scale. *J Nurs Meas.* 1, 165-178.
- Wallace, W. H. B., and Kelsey, T. W. (2010). Human ovarian reserve from conception to the menopause. *PLoS One.* 5, e8772.
- Wang, J., Trudinger, B. J., Duarte, N., Wilcken, D. E., and Li Wang, X. (2000). Elevated circulating homocyst (e) ine levels in placental vascular disease and associated pre-eclampsia. *BJOG.* 107, 935-938.
- Watson, D., Clark, L. A., and Tellegen, A. (1988). Development and validation of brief measures of positive and negative affect: the PANAS scales. *J Pers Soc Psychol.* 54, 1063.
- Weinstock, M. (2008). The long-term behavioural consequences of prenatal stress. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews.* 32, 1073-1086.
- Wilkinson, D., Bain, E., and Wallace, E. (2013). Melatonin for women in pregnancy for neuroprotection of the fetus. *Cochrane Database Syst Rev.* 3.
- Wingenfeld, K., Schulz, M., Damkroeger, A., Rose, M., and Driessen, M. (2009). Elevated diurnal salivary cortisol in nurses is associated with burnout but not with vital exhaustion. *Psychoneuroendocrinology.* 34, 1144-1151.
- Wu, F., Tian, F., Lin, Y., and Xu, W. (2015a). Oxidative Stress: Placenta Function and Dysfunction. *Am J Reprod Immunol.* 76, 258-271.
- Wu, P., van den Berg, C., Alfirevic, Z., O'Brien, S., Röthlisberger, M., Baker, P. N., et al. (2015b). Early pregnancy biomarkers in pre-eclampsia: a systematic review and meta-analysis. *Int J Mol Sci.* 16, 23035-23056.

- Xu, B., and Chang, S. K. (2008). Effect of soaking, boiling, and steaming on total phenolic content and antioxidant activities of cool season food legumes. *Food Chem.* 110, 1-13.
- Zeng, K., Gao, Y., Wan, J., Tong, M., Lee, A., Zhao, M., et al. (2016). The reduction in circulating levels of melatonin may be associated with the development of preeclampsia. *J Hum Hypertens.* 30, 666-671.
- Zhao, Z., Moley, K. H., and Gronowski, A. M. (2013). Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases. *Clin Biochem.* 46, 953-960.
- Zigmond, A. S., and Snaith, R. P. (1983). The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand.* 67, 361-370.
- Zusterzeel, P., Rütten, H., Roelofs, H., Peters, W., and Steegers, E. (2001). Protein carbonyls in decidua and placenta of pre-eclamptic women as markers for oxidative stress. *Placenta.* 22, 213-219.



# Anexos

## **Escalas psicológicas empleadas en esta Tesis Doctoral**

- Escala de afectividad negativa y positiva
- Escala hospitalaria de ansiedad y escala hospitalaria de depresión
- Escala de preocupaciones durante el embarazo
- Escala de optimismo disposicional
- Escala de satisfacción vital
- Escala de recursos generales
- Escala de resiliencia
- Escala de conciliación del ámbito laboral y personal

## **Publicación y capítulo derivados de esta Tesis Doctoral**

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

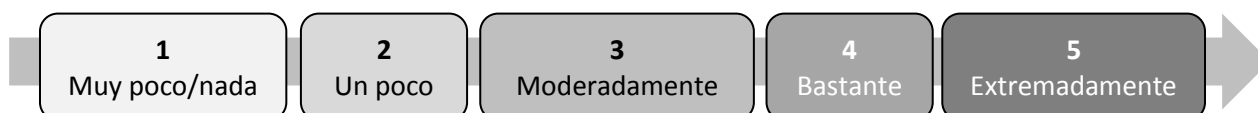
**Ramiro-Cortijo D**, Rodríguez-Rodríguez P, López de Pablo AL, López-Giménez MR, González MC, Arribas SM. Fetal undernutrition and oxidative stress: Influence of sex and gender. In Preedy VR & Patel VB (eds.), *Handbook of Famine, Starvation and Nutrient Deprivation*, Springer International Publishing AG 2017.

### Escala de afectividad negativa y positiva

*Positive and Negative Affect Schedule*<sup>1</sup> (PANAS).

*Versión española*<sup>2</sup>.

Esta escala consiste en un número de palabras que describen diferentes sentimientos y emociones. Lea cada ítem y señale en qué medida siente o experimenta estas emociones de manera general en su vida, usando la siguiente escala de respuesta:



Interesada →	Irritable →
Angustiada →	Alerta →
Excitada →	Avergonzada →
Contrariada →	Inspirada →
Fuerte →	Nerviosa →
Culpable →	Decidida →
Asustada →	Atenta →
Hostil →	Agitada →
Entusiasmada →	Activa →
Orgullosa →	Miedosa →

<sup>1</sup> Watson D, Clark LA, Tellegen A. Development and validation of brief measures of positive and negative affect: the PANAS scales. *Journal of personality and social psychology*. 1988; 54:1063-70.

<sup>2</sup> Moriondo M, De Palma P, Medrano LA, Murillo P. Adaptación de la Escala de Afectividad Positiva y Negativa (PANAS) a la población de adultos de la ciudad de Córdoba: análisis psicométricos preliminares. *Universitas Psychologica*. 2012; 11:187-196.

## Escala hospitalaria de ansiedad y escala hospitalaria de depresión

*The Hospital Anxiety and Depression Scale*<sup>3</sup> (HADS).

Versión española<sup>4</sup>.

*Ansiedad:*

Rodea el número en cada afirmación que más se ajuste a tu forma de pensar.

- |   |  |
|---|--|
| <b>1. Me siento tenso/a y molesto/a</b>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>0. Nunca</li> <li>1. A veces</li> <li>2. Muchas veces</li> <li>3. Todos los días</li> </ul>   |
| <b>2. Tengo una gran sensación de miedo, como si algo horrible me fuera a suceder</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>0. Nada</li> <li>1. Un poco, pero no me preocupa</li> <li>2. Sí, pero no es muy fuerte</li> <li>3. Totalmente, y es muy fuerte</li> </ul>           |
| <b>3. Tengo la cabeza llena de preocupaciones</b>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>0. Sólo en ocasiones</li> <li>1. A veces, aunque no muy a menudo</li> <li>2. Con bastante frecuencia</li> <li>3. La mayoría de las veces</li> </ul> |
| <b>4. Puedo estar sentado/a tranquilamente y sentirme relajado/a</b>                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>0. Siempre</li> <li>1. Por lo general</li> <li>2. No muy a menudo</li> <li>3. Nunca</li> </ul>  |
| <b>5. Tengo sensación de miedo, como de “aleteo en el estómago”</b>                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>0. Nunca</li> <li>1. En ciertas ocasiones</li> <li>2. Con bastante frecuencia</li> <li>3. Muy a menudo</li> </ul>                                   |
| <b>6. Me siento inquieto/a, como si estuviera continuamente en movimiento</b>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>0. Nada</li> <li>1. No mucho</li> <li>2. Bastante</li> <li>3. Mucho</li> </ul>  |
| <b>7. Me asaltan sentimientos repentinos de pánico</b>                                | <ul style="list-style-type: none"> <li>0. Nada</li> <li>1. No muy a menudo</li> <li>2. Bastante a menudo</li> <li>3. Muy frecuentemente</li> </ul>   |

<sup>3</sup> Zigmond AS, Snaith RP. The hospital anxiety and depression scale. *Acta psychiatrica scandinavica*. 1983; 67: 361-370.

<sup>4</sup> López-Roig S, Terol MC, Pastor MA, Neipp MC, Massutí B, Rodríguez-Marín J, et al. Ansiedad y depresión. Validación de la escala HAD en pacientes oncológicos. *Revista de Psicología de la Salud*. 2000; 12: 127-155.

*Depresión:*

Rodea el número en cada afirmación que más se ajuste a tu forma de pensar.

- |  |   |
|--|---|
| <b>1. Todavía disfruto con lo que antes me gustaba ...</b>                   | 0. Como siempre<br>1. No lo bastante<br>2. Sólo un poco<br>3. Nada  |
| <b>2. Puedo reírme y ver el lado divertido de las cosas</b>                  | 0. Igual que lo hice siempre<br>1. Ahora, no tanto<br>2. Casi nunca<br>3. Nunca   |
| <b>3. Me siento alegre</b>   | 0. Casi siempre<br>1. A veces<br>2. No muy a menudo<br>3. Nunca   |
| <b>4. Me siento como si cada día estuviera más lento</b>                     | 0. Nunca<br>1. A veces<br>2. Muy a menudo<br>3. Por lo general, en todo momento   |
| <b>5. He perdido el interés por mi aspecto físico</b>                        | 0. Me preocupo igual que siempre<br>1. Podría tener un poco más de cuidado<br>2. No me preocupo como debería<br>3. Totalmente |
| <b>6. Me siento optimista respecto al porvenir</b>                           | 0. Igual que siempre<br>1. Menos de lo que acostumbraba<br>2. Mucho menos de lo que acostumbraba<br>3. Nada                   |
| <b>7. Me divierto con un buen libro la radio o un programa de televisión</b> | 0. A menudo<br>1. A veces<br>2. No muy a menudo<br>3. vez   |

### Escala de preocupaciones durante el embarazo

*Elaborado por el Dr. Moreno del equipo de investigación (Facultad de Psicología-UAM).*

A continuación, encontrará algunas preocupaciones que podría tener usted acerca del desarrollo de su embarazo. Rodee el grado con que le preocupan las siguientes afirmaciones:

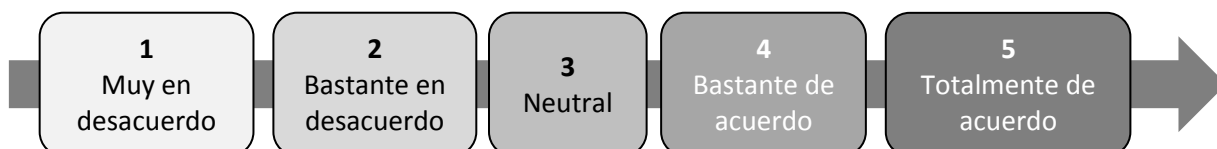
	NADA	ALGO	BASTANTE	MUCHO
1. La salud y la normalidad del niño/a	0	1	2	3
2. El estado del niño/a cuando nazca	0	1	2	3
3. La pérdida del atractivo físico personal	0	1	2	3
4. Los problemas económicos que puedan aparecer	0	1	2	3
5. La atención médica en el momento del parto	0	1	2	3
6. La anestesia en el parto	0	1	2	3
7. Algunos problemas familiares que puedan aparecer	0	1	2	3
8. La reacción de mi compañero/marido todo este tiempo	0	1	2	3
9. El efecto de las medicinas más sobre el feto	0	1	2	3
10. Defectos hereditarios del niño/a	0	1	2	3

### Escala de optimismo disposicional

*Life Orientation Test*<sup>5</sup> (LOT).

Versión española<sup>6</sup>.

Usando la siguiente escala, rodee la respuesta que mejor describa su grado de acuerdo con cada frase.



	1. Siempre soy optimista acerca de mi futuro	1	2	3	4	5
	2. Siempre miro el lado positivo de las cosas	1	2	3	4	5
3.	En general, espero que me ocurran más cosas buenas que malas	1	2	3	4	5
	4. Casi nunca espero que las cosas me sean favorables	1	2	3	4	5
	5. Rara vez confío en que las cosas buenas me sucedan a mí	1	2	3	4	5

<sup>5</sup> Scheier MF, Carver CS, Bridges MW. Distinguishing optimism from neuroticism (and trait anxiety, self-mastery, and self-esteem): a reevaluation of the Life Orientation Test. *Journal of personality and social psychology*. 1994; 67: 1063.

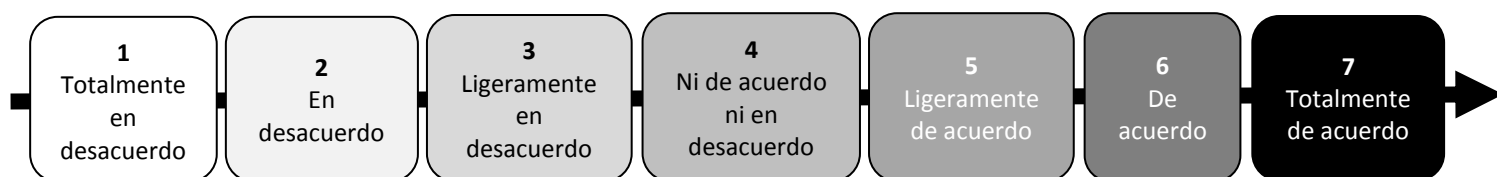
<sup>6</sup> Ferrando PJ, Chico E, Tous JM. Propiedades psicométricas del test de optimismo Life Orientation Test. *Psicothema*. 2002; 14:673-680.

### Escala de satisfacción vital

*Life Satisfaction*<sup>7</sup>.

*Versión española en embarazadas*<sup>8</sup>.

A continuación, aparecerán unas frases con las que usted puede o no estar de acuerdo. Usando la siguiente escala de respuesta, indique su grado de acuerdo o desacuerdo con cada una de ellas. Por favor, sea honesta en sus respuestas.



- A. En general, mi vida real se acerca a mi vida ideal → \_\_\_\_\_
- B. Las condiciones de mi vida son excelentes → \_\_\_\_\_
- C. Estoy satisfecho/a con mi vida → \_\_\_\_\_
- D. Hasta ahora, he conseguido las cosas que me importan realmente en la vida → \_\_\_\_\_
- E. Si volviera a vivir, creo que no cambiaría casi nada → \_\_\_\_\_

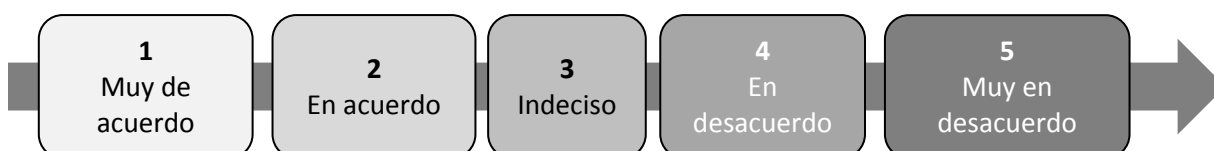
<sup>7</sup> Diener ED, Emmons RA, Larsen RJ, Griffin S. The satisfaction with life scale. *Journal of personality assessment*. 1985; 49: 71-75.

<sup>8</sup> Cabañero M, Richart M, Cabrero J, Orts M, Reig A, Tosal B. Fiabilidad y validez de la Escala de Satisfacción con la Vida de Diener en una muestra de mujeres embarazadas y púerperas. *Psicothema*. 2004; 16:448-455.

### Escala de recursos generales

Elaborado por el Dr. Moreno del equipo de investigación (Facultad de Psicología-UAM).

Según la siguiente escala, rodee la opción que mejor se adecue a su situación actual.



- |  |   |   |   |   |   |
|--|---|---|---|---|---|
| 1. No tengo problemas económicos importantes       | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 2. Mi vida emocional es satisfactoria              | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 3. Mi estado de salud es bueno                     | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 4. Tengo buenos amigos                             | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 5. Mi vida familiar es buena                       | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 6. Hago algún tipo de ejercicio                    | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 7. Tengo actividades sociales frecuentes           | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 8. Considero que mi alimentación es sana           | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| 9. Tengo actividades personales muy satisfactorias | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

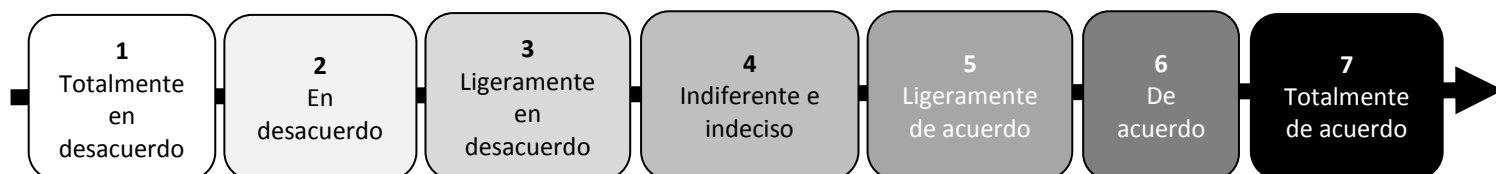


## Escala de resiliencia

*Resilience*<sup>9</sup>.

*Versión española*<sup>10</sup>.

Marque en las siguientes afirmaciones la calificación que mejor exprese su forma de ser, utilizando la escala numérica indicada.



- |  |   |   |   |   |   |   |   |
|--|---|---|---|---|---|---|---|
| 1. En cualquier situación, generalmente me las arreglo de una manera u otra. | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 2. Es importante para mí mantenerme interesado/a en las cosas.               | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 3. Me siento orgulloso/a de haber logrado cosas en mi vida.                  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 4. Generalmente veo las cosas a largo plazo.                                 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 5. Tengo auto-disciplina.  | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 6. El creer en mí mismo/a me permite atravesar tiempos difíciles.            | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |

<sup>9</sup> Wagnild GM, Young HM. Development and psychometric evaluation of the Resilience Scale. *Journal of nursing measurement*. 1993; 1:165-178.

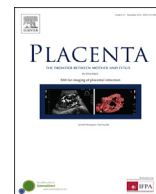
<sup>10</sup> Rodríguez M, Pereyra MG, Gil E, Jofré M, De Bortoli M, Labiano LM. Propiedades psicométricas de la escala de resiliencia versión argentina. *Revista Evaluar*. 2009; 9:72-82.

### Escala de conciliación del ámbito laboral y personal

*Elaborado por el Dr. Moreno del equipo de investigación (Facultad de Psicología-UAM).*

A continuación, encontrará una serie de situaciones acerca de cómo se relacionan sus ámbitos laboral y personal. Por favor, indique con qué frecuencia ha experimentado cada una de las siguientes afirmaciones durante los últimos 6 meses. Rodee el número en cada caso que mejor describa su opinión según la escala:

	<b>NUNCA</b>	<b>A VECES</b>	<b>A MENUDO</b>	<b>SIEMPRE</b>
1. Está irritable en casa porque su trabajo es muy agotador	0	1	2	3
2. Le resulta complicado atender a sus obligaciones domésticas porque está constantemente pensando en su trabajo	0	1	2	3
3. Tiene que cancelar planes con su pareja/familia/amigos debido a compromisos laborales	0	1	2	3
4. Su horario de trabajo hace que resulte complicado para usted atender a sus obligaciones domésticas	0	1	2	3
5. No tiene energía suficiente para realizar actividades de ocio con su pareja/familia/amigos debido a su trabajo	0	1	2	3
6. Tiene que trabajar tanto que no tiene tiempo para sus hobbies	0	1	2	3



## Maternal plasma antioxidant status in the first trimester of pregnancy and development of obstetric complications



David Ramiro-Cortijo <sup>a,1</sup>, Teresa Herrera <sup>b,1</sup>, Pilar Rodríguez-Rodríguez <sup>a</sup>, Ángel L. López De Pablo <sup>a</sup>, María De La Calle <sup>c</sup>, María R. López-Giménez <sup>d</sup>, Ana I. Mora-Urda <sup>e</sup>, Perla Y. Gutiérrez-Arzapalo <sup>a</sup>, Rubén Gómez-Rioja <sup>f</sup>, Yolanda Aguilera <sup>b</sup>, María A. Martín-Cabrejas <sup>b</sup>, Luis Condezo-Hoyos <sup>a</sup>, M. Carmen González <sup>a</sup>, Pilar Montero <sup>e</sup>, Bernardo Moreno-Jiménez <sup>g</sup>, Silvia M. Arribas <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Physiology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

<sup>b</sup> Department of Agricultural and Food Chemistry-CIAL, Faculty of Sciences, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

<sup>c</sup> Obstetrics and Gynecology Service, La Paz University Hospital, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

<sup>d</sup> Department of Preventive Medicine, Public Health & Microbiology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

<sup>e</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

<sup>f</sup> Laboratory Medicine Service, La Paz University Hospital, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

<sup>g</sup> Department of Biological and Health Psychology, Faculty of Psychology, Universidad Autónoma de Madrid, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 18 May 2016

Received in revised form

22 July 2016

Accepted 27 August 2016

#### Keywords:

Antioxidants

Obstetric complications

Plasma

Pregnancy

Biomarker

### ABSTRACT

**Introduction:** Oxidative stress is present in pregnancy complications. However, it is unknown if early maternal antioxidant status could influence later development of complications. The use of assisted reproduction techniques (ART) is rising due to the delay of first pregnancy and there is scarce information on its influence on oxidative balance.

**Objective:** To assess the possible relationship between maternal plasma antioxidant status in first trimester of gestation with later development of pregnancy complications, evaluating the influence of ART and nutrition.

**Methods:** Plasma from 98 healthy pregnant women was obtained at week 10, nutrition questionnaires filled and women were followed until delivery. We evaluated biomarkers of oxidative damage (carbonyls, malondialdehyde-MDA), antioxidants (thiols, reduced glutathione, phenolic compounds, catalase and superoxide dismutase activities) by spectrophotometry/fluorimetry and melatonin (ELISA). Antioxidant status score (Antiox-S) was calculated as the computation of antioxidants. Diet-antioxidants relationship was evaluated through multiple correspondence analysis.

**Results:** Melatonin and carbonyls exhibited a negative correlation. No difference in oxidative damage was found between groups, but Antiox-S was significantly lower in women who developed complications. No differences in oxidative damage or Antiox-S were found between ART and no-ART pregnancies. High consumption of foods of vegetable origin cluster with high plasma levels of phenolic compounds and with high Antiox-S.

**Conclusions:** In early normal gestation, low plasma antioxidant status, assessed through a global score, associates with later development of pregnancy complications. Larger population studies could help to determine the value of Antiox-S as predictive tool and the relevance of nutrition on maternal antioxidant status.

© 2016 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

The age of first pregnancy has been gradually increasing in industrialized countries [1–3]. Advanced maternal age reduces fertility, increasing the need of assisted reproduction techniques

\* Corresponding author. Department of Physiology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, C/Arzobispo Morcillo 2, 28029 Madrid, Spain.

E-mail address: [silvia.arribas@uam.es](mailto:silvia.arribas@uam.es) (S.M. Arribas).

<sup>1</sup> These authors have contributed equally to the work.

(ART) and it is associated with a rise in the development of obstetric complications, particularly pre-eclampsia, hypertension and gestational diabetes [1,4]. In addition to immediate consequences for maternal health, these complications also have negative long term effects for the offspring, programming the development of cardiometabolic diseases [5].

The identification of biomarkers in early pregnancy is desirable in order to prevent or decrease the impact of gestation-related pathologies. Several potential biomarkers, including inhibin-A, pregnancy associated plasma protein A (PAPP-A), placental growth factor (PlGF) and placental protein 13 (PP-13) [6] as well as several miRNAs [7] have been evaluated in the first and second trimester of pregnancy. However, low predictive values have been found when these biomarkers were considered individually [6] and a multiple marker approach has been suggested [7]. In addition to the above mentioned biomarkers, oxidative stress-related molecules could be explored, based on the fact that pregnancy complications have been associated with oxidative damage [8–10]. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in gestation, but in excess, they might override the antioxidant systems and contribute to oxidative damage. An important ROS elevation takes place between weeks 10<sup>th</sup>–12<sup>th</sup> of gestation, when oxygen tension rises steeply within the placenta as the maternal circulation is established. Under physiological conditions, this is matched with an increase of the main endogenous antioxidants -superoxide dismutases (Cu/Zn and Mn SODs), catalase, glutathione (GSH) and glutathione peroxidase (GPx) [11,12]. However, if there is an inadequate production of antioxidants, oxidative balance is lost and oxidative damage might contribute to the development of pregnancy disorders [11,12].

Another important endogenous antioxidant during pregnancy is melatonin. This hormone is secreted by the pineal gland related to the duration of darkness and it is also synthesized by the placenta throughout pregnancy [13,14]. Melatonin diffuses through biological membranes and exerts direct ROS scavenging effects and also increases expression of other endogenous antioxidants [15–17]. This hormone seems to be essential for successful gestation and has an important role in embryo-fetal development [15,18]. Moreover, melatonin treatment has been demonstrated to reduce placental oxidative stress in complications associated with placental insufficiency [18,19].

Oxidative status is not only determined by endogenous antioxidants, but it is also modulated by diet-derived compounds. Fruits, vegetable and beverages are the major source of antioxidants in the diet, particularly phenolic compounds and vitamins [20] which contribute to the global pool of antioxidants. In the context of pregnancy it has been demonstrated that consumption of a mediterranean-style dietary pattern –rich in fruits, vegetables and cereals- during periconceptional period reduces the risk of hypertension-related pregnancy disorders [21]. Melatonin and its precursor tryptophan are also present in some food items, being universal in plants and it is also a natural compound found in milk [22]. Due to its biological activity and bioavailability, it has been proposed that the consumption of foods containing melatonin may improve human health [23].

The studies evaluating oxidative-related biomarkers in pregnancy complications have been performed in the last trimester of pregnancy, when the complication has already been diagnosed [8,9]. At this stage, redox balance alterations might be consequence of the pathology itself [24]. In normal pregnancies, adequate levels of maternal antioxidants during the first trimester of gestation seem to be important to counteract early ROS elevation [11,12]. Therefore, we hypothesize that a low maternal antioxidant status in the first trimester of pregnancy can play a role in the later development of an obstetric complication. To test

our hypothesis, we have evaluated several plasma biomarkers of oxidative status in a group of normal pregnant women at 10th week of gestation. The complex chain reaction nature of ROS and antioxidants makes difficult to assign a prevalent role to a particular molecule and the calculation of a score (based on the computation of individual biomarkers) has been proposed as a better strategy to evaluate global redox state [25]. We have previously adapted methods for quick assessment of the main oxidative status biomarkers in small plasma volume and applied this score to assess global oxidative status in patients [26] [27] and experimental animals [28]. In the present study we have calculated a similar global score of antioxidant status (Antiox-S) and have evaluated its relationship with obstetric complication development. Finally, since diet-derived antioxidants might play a modulator role on global redox balance, we also aimed to assess the relationship between maternal nutrition and plasma antioxidant status.

## 2. Material and methods

### 2.1. Population of study

We recruited 98 healthy pregnant women at the Obstetrics and Gynecology Service from La Paz University Hospital (Madrid, Spain). Exclusion criteria were women with present or previous cardiovascular disease or risk factors. Women entered the study at 9 weeks of gestation. At this time they signed an Informed Consent, the use of ART was recorded and the women filled two questionnaires regarding their socio-economic status and dietary habits. A blood sample was obtained at 10 weeks of gestation to determine biochemical and hematological parameters and to assess plasma biomarkers of oxidative status. The women were followed-up at the Obstetrics and Gynecology Service until delivery and the development of maternal severe or minor complications was recorded. Severe complications included gestational diabetes (glucose levels over 140 mg/dl in the glucose challenge test), preeclampsia (blood pressure over 160/110 mm Hg with proteinuria or thrombocytopenia after 20 weeks of gestation), gestational hypertension (blood pressure over 160/110 mm Hg, without features of preeclampsia) and miscarriage. Minor complications included *Hyperemesis Gravidarum*, skin lesions and anemia.

### Ethical approval

The study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki regarding studies in human subjects and it was approved by Hospital La Paz and the Universidad Autónoma de Madrid Ethical Committees. The women participated in the study anonymously and voluntarily signed an Informed Consent.

### 2.2. Blood sample

At 10 weeks of gestation blood samples were extracted from 8:00 to 9:00 a.m. by venipuncture in Vacutainer® tubes following the protocols established by the medical staff in charge. One sample was used to assess hemoglobin, glucose, cholesterol and triglycerides by the Clinical Laboratory Service of the Hospital as well as other routine parameters requested by the Obstetrics and Gynecology Service. A second sample was obtained in Vacutainer® tubes containing lithium heparin and separation gel. From this blood sample plasma was obtained by centrifugation (2100 g, 15 min at 4 °C) within a maximum of 2 h after extraction. Thereafter, it was immediately aliquoted and stored at –80 °C until use.

### 2.3. Plasma biomarkers of oxidative status

#### 2.3.1. Total protein carbonyls

Plasma protein carbonyls were assessed by the 2,4-dinitrophenylhydrazine-based assay [29] adapted to a microplate reader [26]. The protein carbonyl concentration was determined using extinction coefficient of 2,4-dinitrophenylhydrazine ( $\epsilon = 22,000 \text{ M/cm}$ ) and expressed as nmol/mg of protein. Protein content was assessed by Coomassie-blue-based microtiter plate assay, according to manufacturer's instructions (Bio-Rad). The absorbance was measured at 370 nm in a microplate reader (Synergy HTMultimode; BioTek).

#### 2.3.2. Malondialdehyde (MDA)

The concentration of plasma MDA was measured by a spectrophotometric method detecting Thiobarbituric Acid (TBA) reactive substances as previously described [30]. Briefly, the plasma samples were incubated with TCA, EDTA, SDS and BHT, followed by addition of TBA and boiled in a water bath at  $100^\circ\text{C}$  for 30 min. After cooling, the mixture was centrifuged at  $10,000 \text{ g}$  and the absorbance was measured at 532 nm and compared with a standard curve of 1,1,3,3-tetraethoxypropane.

#### 2.3.3. Reduced glutathione (GSH)

Plasma GSH was assessed by a fluorimetric method based on the reaction with o-phthalaldehyde [31] and adapted to a microplate reader [26]. Fluorescence was measured at  $360 \pm 40 \text{ nm}$  excitation and  $460 \pm 40 \text{ nm}$  emission wavelengths. GSH concentration in the samples was expressed as  $\mu\text{mol/mg}$  of protein.

#### 2.3.4. Total thiols

Plasma thiols were assessed by a modification of the method based on 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) assay [29] adapted to a microplate reader, as previously described [26]. The absorbance was measured at 412 nm and thiol content was expressed as nM GSH/mg of protein.

#### 2.3.5. Superoxide anion scavenging activity (SOSA)

Superoxide ( $\text{O}_2^-$ ) scavenging activity quantification was assessed by SOSA assay based on the inhibition of luminescence emitted by coelenterazine (CTZ) when is oxidized by  $\text{O}_2^-$  [32], adapted to a microplate reader [27,32]. SOSA values were quantified by comparing the luminescence inhibition of each sample with a SOD activity standard curve ( $0\text{--}4 \text{ U/ml}$ ) and expressed as mU SOD/mg of protein. SOSA assay evaluates all the plasma antioxidants capable to eliminate  $\text{O}_2^-$  and has been used as global measure of superoxide dismutase (SOD) activity [27,28].

#### 2.3.6. Catalase activity

Catalase activity was assessed by Amplex Red catalase assay (EnzChek Myeloperoxidase Assay Kit with Amplex Ultra Red reagent; Invitrogen). Catalase activity was expressed as U/mg of protein.

#### 2.3.7. Melatonin

To assess melatonin levels, plasma was first evaporated to dryness with an evaporator centrifuge (Speed Vac SC 200; Savant, USA). The residues were dissolved in distilled water and melatonin levels were determined by a competitive enzyme immunoassay kit (Melatonin ELISA; IBL International, Germany) according to manufacturer's instructions. The kit is characterized by an analytical sensitivity of  $1.6 \text{ pg/ml}$  and high analytical specificity (low cross-reactivity). Melatonin was expressed as pg/ml.

#### 2.3.8. Food-derived antioxidants

Folin-Ciocalteu assay, modified to remove protein interference, was used to assess food-derived antioxidants, mainly phenolic compounds and ascorbic acid [33]. Absorbance was measured at 760 nm and the results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE) per litre (mg GAE/l).

#### 2.3.9. Calculation of the global score of antioxidant status (Antiox-S)

A global antioxidant score (Antiox-S) was calculated for each subject taking into account the antioxidant biomarkers measured in plasma (GSH, total thiols, SOSA, catalase activity and phenolic compounds). The calculation uses the statistical methodology previously described, which normalizes and standardizes each of the parameters of interest, enabling to sum parameters of different units [26,28]. Firstly, we analyzed the normality of each antioxidant biomarker assessed ( $j$ ) through the Kolmogorov–Smirnov test. Those parameters that did not exhibit a normal distribution were normalized through a logarithmic transformation ( $\log j$ ). Once normalized, the parameter was standardized for each subject ( $i$ ). For this, the mean ( $M_j$ ) and standard deviation ( $\text{STDV}_j$ ) were calculated taking into account all the data in the population studied and the standardized parameter ( $Z_{ij}$ ) was calculated as follows:

$Z_{ij} = (X_{ij} - M_j) / \text{STDV}_j$ , where  $X_{ij}$  is the raw normalized parameter for each subject.

Antiox-S was then calculated for each woman as the sum of standardized antioxidants. The advantage of this method is that every subject has an individualized score at a time point. Antiox-S is statistically treated as any other parameter, evaluating differences between groups (complicated versus no complicated pregnancies, ART versus non-ART).

### 2.4. Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. Student's  $t$ -test was used to assess statistical differences between groups in those parameters that followed a normal distribution and Mann Withney test for those which did not fit a normal distribution.  $\chi^2$ -test was used for the analysis of the relationship between qualitative variables. Statistical significant level was established at  $p < 0.05$ .

A multivariate logistic regression analysis was used to evaluate the influence of age and ART on pregnancy complications.

Multiple Correspondence Analysis was performed to examine the relationship between several nominal variables in a multidimensional space. This analysis generates plots that graphically illustrate the underlying relationship between categories of these variables. Optimum dimensional reduction was used to assess the relationship between variables using the discriminant dimension as  $\alpha$  Cronbach.

## 3. Results

### 3.1. Population of study

In the studied sample ( $n = 98$ ), 63 women had spontaneous pregnancies and 35 had ART pregnancies, the majority of which were derived from *in vitro* fertilization techniques. The analyzed population had an average age of  $34.5 \pm 0.5$  years. Women on ART had a significantly higher average age compared to non-ART (ART =  $36 \pm 0.7$  years; non-ART =  $33.9 \pm 0.6$  years;  $p = 0.027$ ).

Regarding socio-economic aspects, 91.6% of the women reported being employed. Regarding income level, the women were classified as low-middle if they earned between 600 and 1500€/month and upper if they had an income above 1500 €/month, according to the Spanish population income level [34]. With

respect to the level of studies, 74.7% of the total population reported a higher degree.

64.3% of the women had normal pregnancies and 35.7% developed any type of complication (13.7% severe and 22.0% minor). Severe complications were distributed as follows: 4.4% pre-eclampsia, 4.4% gestational diabetes, 2.2% gestational hypertension and 2.7% miscarriage.

A significantly higher prevalence of pregnancy complications was found in women with a lower educational level compared to women with higher studies. No significant differences were found regarding other socio-economic aspects evaluated (civil status or income level) or the intake of the different food categories evaluated (Table 1).

The incidence of complications was significantly higher in ART pregnancies compared to non-ART (ART = 53.1%; non-ART = 31.0%;  $p < 0.04$ ;  $\chi^2$  test). Applying a logistic regression model we found that the probability to have a pregnancy complication was 2.79 times larger in ART pregnancies ( $p = 0.041$  with a confidence interval of 1.04–7.49).

### 3.2. Biochemical parameters

Blood hematological and biochemical parameters at 10th week were all within the normal range. Triglyceride levels were higher in ART pregnancies compared to non-ART. Triglycerides were also higher in women who developed a pregnancy complication compared with those with normal pregnancy (Table 2).

There was no statistical difference in plasma carbonyl groups comparing normal pregnancies with those that developed an obstetric complication (Fig. 1A), or between ART and non-ART pregnancies (Fig. 1B). Similarly, we did not detect statistical differences in MDA levels between complicated versus non complicated pregnancies (Fig. 1C) or between ART and non-ART pregnancies (Fig. 1D).

We did not detect statistical difference in the levels of diurnal melatonin comparing normal pregnancies with those that developed an obstetric complication (Fig. 2A), or between ART and non-ART pregnancies, although there was a tendency towards lower melatonin levels in ART pregnancies (Fig. 2B). A negative and significant correlation was found between melatonin and carbonyl groups ( $n = 80$ ;  $r = -0.303$ ;  $p = 0.01$ ).

Individual plasma antioxidants, except SOSA, tended to be lower

in women who developed a maternal complication, but we did not detect statistical differences between them (Table 3). However, the global score Antiox-S was significantly lower in women who developed a complication compared with normal pregnancies. The group with severe complications tended to have a lower Antiox-S, but we did not find a statistical significance, probably due to the low sample size (Fig. 2C). We did not detect statistical differences in Antiox-S comparing ART with non-ART pregnancies (Fig. 2D).

The relationship between diet and antioxidants was determined with a multiple correspondence analysis. We found that a high intake of fruits and vegetables keeps relationship with higher plasma levels of phenolic compounds and with high Antiox-S. Similarly, diets deficient in fruits and vegetables are grouped with low levels of these antioxidant compounds (Cronbach  $\alpha = 0.56$ ; Fig. 3A).

On the other hand, low level of milk consumption (weekly intake) is grouped with lower levels of plasma melatonin and higher carbonyls (Cronbach  $\alpha = 0.41$ ; Fig. 3B).

## 4. Discussion

The age of first pregnancy is rising in industrialized societies, increasing the possibility to develop pregnancy complications. Therefore, it would be desirable to detect women at risk at early stages of pregnancy. Since oxidative stress is associated with several obstetric complications, we aimed to assess if plasma antioxidant status of the mother in early gestation has a relationship with later development of a complication, and thus, could be of predictive value. The increase in the age of first pregnancy is also linked to the need of assisted reproduction and, therefore, we have also evaluated if ART modifies oxidative balance. The main findings of the present study are that: 1) the development of a pregnancy complication is associated with low plasma global antioxidant status (evaluated through a score) in the first trimester of gestation; 2) the use of ART does not affect early antioxidant status and 3) there is an association between fruit and vegetable consumption and exogenous antioxidants in plasma as well as between milk intake and plasma melatonin levels.

The women included in our study were over the optimum reproductive age - established between 20 and 30 years old [35] and even slightly above the average of the Spanish population [34]. This is likely due to the fact that our study included a group of

**Table 1**  
Socio-economic and dietary habits in women with or without pregnancy complications.

			Normal pregnancy (%)	Pregnancy complications (%)
Socio-economic	Civil status	Married	64.4	35.6
		Single	68.0	32.0
	Studies	Basic	33.3	66.7*
		Higher	76.9	23.1
	Income	Low-Middle	40.0	60.0
Upper		69.7	30.3	
Dietary habits	Fruit and vegetables	Low	5.3	3.4
		Moderate	61.4	79.3
		High	33.3	17.2
	Milk	Moderate	41.7	58.3
		High	68.1	31.9
	Meat or fish	Low	61.5	38.5
		Moderate	58.1	41.9
		High	82.8	17.2
	Pasta or beans	Low	68.3	31.7
		Moderate	61.0	39.0
	Candies	Never	71.4	28.6
		Low	66.7	33.3
		Moderate	53.3	46.7

Data represent percentage in the population. Income level was classified as low-middle (600–1500 €/month) or upper (>1500 €/month). Intake categories were classified as: low (1–2 times/week), moderate (3–6 times/week) and high (1–2 times/day); \* $p < 0.05$  when compared to women with higher education studies;  $\chi^2$  test.



**Table 2**  
Hematological and biochemical parameters.

	Normal pregnancy	Pregnancy complications	Non-ART pregnancy	ART pregnancy
Hemoglobin (g/dl)	13.05 ± 0.15 (40)	13.17 ± 0.13 (27)	13.05 ± 0.14 (49)	13.01 ± 0.17 (24)
Glucose (mg/dl)	85.2 ± 1.5 (49)	82.5 ± 1.2 (35)	85.1 ± 1.1 (60)	83 ± 1.8 (32)
Cholesterol (mg/dl)	179 ± 3.9 (49)	173 ± 4.8 (35)	173 ± 3.7 (60)	181 ± 4.2 (32)
Triglycerides (mg/dl)	84.8 ± 4.3 (48)	108 ± 5.6** (35)	87.8 ± 4 (60)	110.5 ± 7.9** (31)

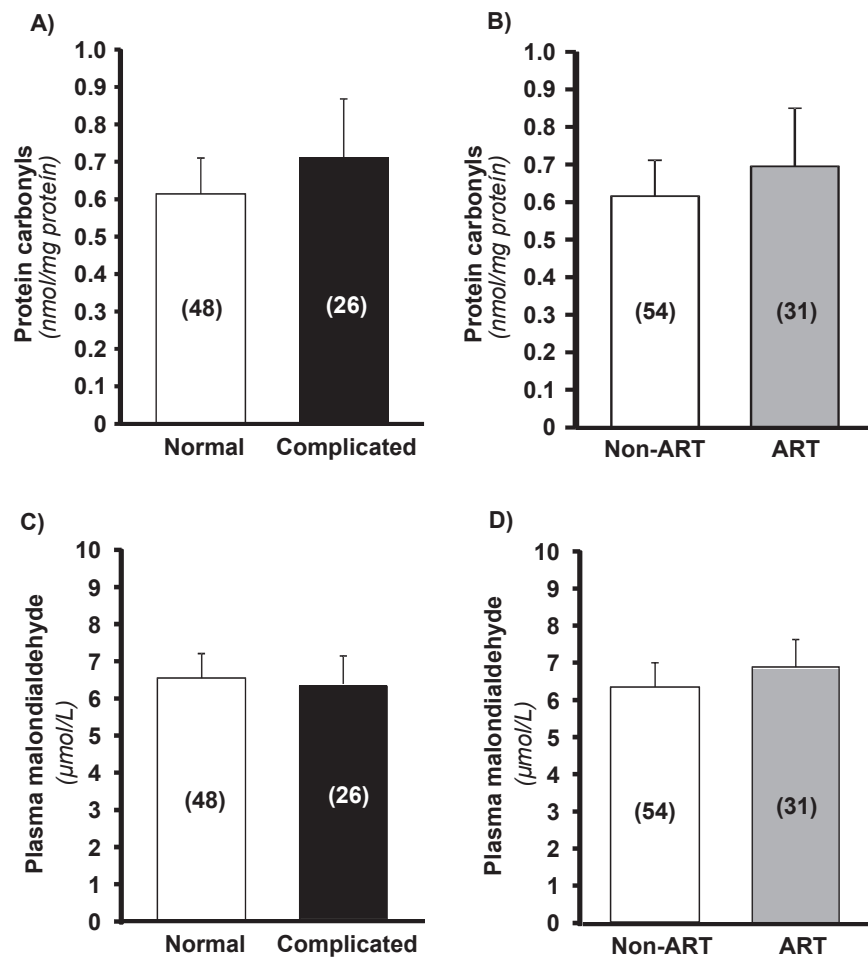
Mean ± SEM. In parenthesis the number of cases; \*\* $p < 0.001$  compared to the respective study group, Student's  $t$ -test.

women using ART, which were older than the group with spontaneous gestation. Our data reflects the overall tendency in Spain, showing that the age of first pregnancy has been increasing in the last three decades [1,34], similarly to the trend in other industrialized countries [2,3,36]. Among other reasons, this is due to the social evolution leading to some important changes regarding the role of women in society and in the traditional family; including a gradual increase in the access to employment, particularly in women with higher education, as shown by European statistics [37]. Despite the important incorporation of women to employment, statistical data show that they still encounter important difficulties to conciliate family with work life, being this one of the main reasons to postpone pregnancy. Our population of study lies within this category, i.e. over 90% of the women had a job.

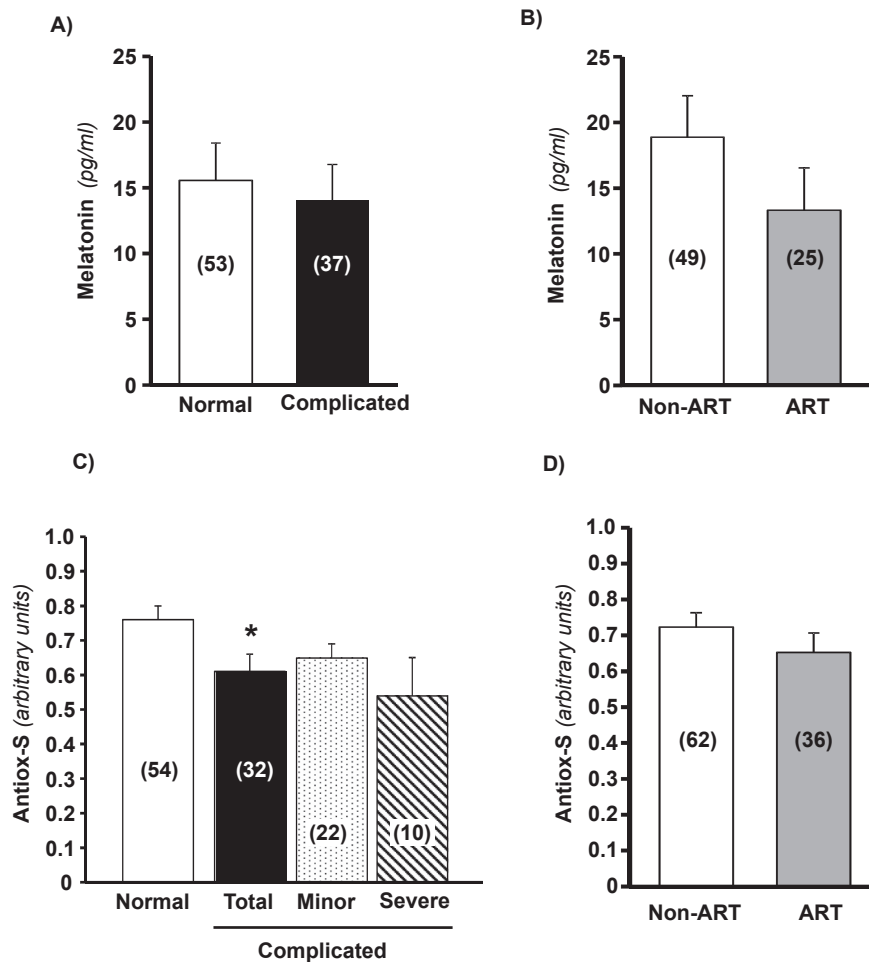
In association with the increase in maternity age, the prevalence

of pregnancy complications has been rising in the last 2 decades, being 2–9% for gestational diabetes [38], and 2–8% for pre-eclampsia [39,40]. Similar values were found in our population of study. As previously described [41], we observed a higher prevalence of pregnancy complications in women using ART. This was also demonstrated when adjusted by age, suggesting that it is not related to the fact that women using ART were older. We also found that the percentage of complications was higher in women with lower educational level. We suggest this could be related to the fact that women with higher studies might be more concerned about health habits and have a better life style behavior.

At 10 weeks of pregnancy, when plasma biomarkers were assessed, the women included in this study were healthy, with no signs of obstetric complication and had normal biochemical and hematological parameters. Despite the fact that triglyceride levels



**Fig. 1.** Plasma protein carbonyls in normal and complicated pregnancies (A) and in non-ART and ART pregnancies (B). Malondialdehyde levels in normal and complicated pregnancies (C) and in non-ART and ART pregnancies (D). Graphs represent the mean and SEM. The number of cases in each group is shown between brackets. Statistical analysis was performed with Student's  $t$ -test.



**Fig. 2.** Plasma melatonin in normal and complicated pregnancies (A) and in non-ART and ART pregnancies (B). Global antioxidant score (Antiox-S) in normal and complicated pregnancies, including total number and broken down into minor and severe complications (C). Global antioxidant score (Antiox-S) in non-ART and ART pregnancies (D). Graphs represent the mean and SEM. The number of cases in each group is shown between brackets. \* $p < 0.05$  when compared with normal pregnancy group. Statistical analysis was performed with Student's *t*-test.

were within the normal range, they were significantly higher at 10 week in women who developed a complication. Other studies have reported that women with preeclampsia exhibit an elevation of plasma triglycerides in the third trimester of pregnancy [10]. Therefore, the possibility that triglycerides could be an early biomarker of pregnancy complications deserves further attention. The detection of early predictive biomarkers for gestational complications is of great interest since it would help to prevent or decrease the impact of these pathologies. Several molecules detectable in plasma have been proposed to be altered in the first and second trimesters of pregnancy, mostly associated with preeclampsia. Among others a recent metaanalysis suggests that a low PIGF in early gestation seems to be the best predictive biomarker of

preeclampsia [6]. However, these and other authors point out that measurement of a single biomarker might not be appropriate and suggest that a multiple approach –including several plasma biomarkers or the combination of a plasma biomarker with clinical parameters– is a better strategy [6,7]. A similar idea lies behind the use of Antiox-S proposed in the present study. This score is based on multiple plasma antioxidants, which enables to assess the global antioxidant status of an individual. We focused on oxidative status, since gestational complications, particularly those related to placental insufficiency, have been associated with oxidative stress [8–10]. Oxidative stress is a disbalance between production and elimination of ROS. Since ROS are short lived molecules their excess is usually quantified by their products of oxidation, which are more

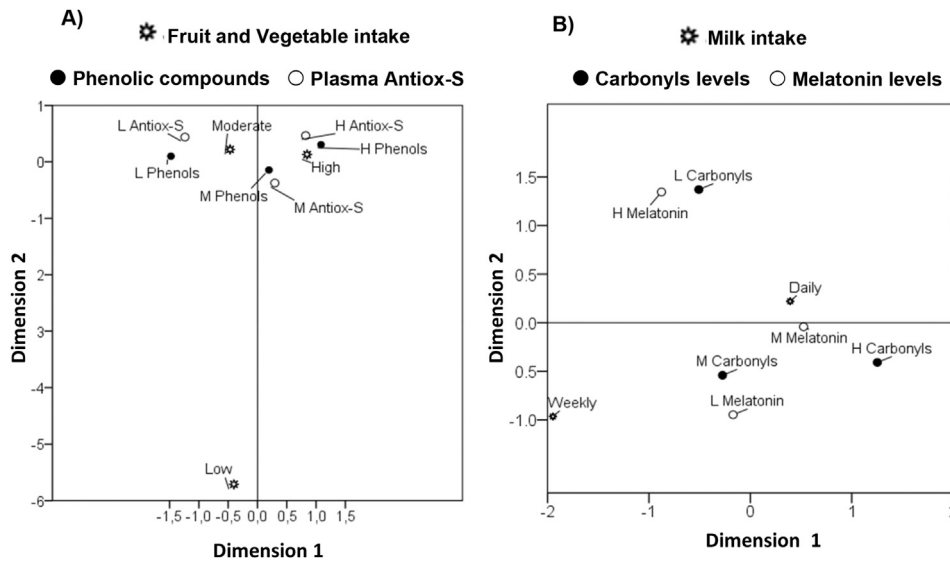
**Table 3**

Plasma antioxidants in women with or without pregnancy complications.

	Normal pregnancy (54)	Pregnancy complications (32)
Catalase activity (U Catalase/mg protein)	0.47 ± 0.08	0.40 ± 0.07
SOSA (U SOD/mg protein)	0.60 ± 0.07	0.61 ± 0.08
GSH (mg GSH/mg protein)	1.74 ± 0.08	1.52 ± 0.08
Thiol groups (mM GSH/mg protein)	0.52 ± 0.03	0.44 ± 0.02
Phenolic compounds (mg GAE/L)	255 ± 7.49	241 ± 7.95

Mean ± SEM. In parenthesis the number of cases; Mann Withney *U* test.





**Fig. 3.** Cluster between fruit and vegetable intake, plasma antioxidant score (Antiox-S) and dietary antioxidants (phenolic compounds) (A). Intake levels were categorized as: high (1–2 per day); moderate (3–6 per week) and low (1–2 per week). Cluster between milk intake and plasma melatonin and protein carbonyl levels (Carbonyls) (B). Intake levels were categorized as: high intake (daily) and low intake (weekly). The levels of plasma parameters (carbonyls, melatonin and polyphenols) and Antiox-S were categorized in quartiles. 1° quartile represents the lowest levels (L), 2° and 3° quartile represents medium levels (M) and above the 3° quartile represents high levels (H).

stable. In a situation of oxidative stress, the first targets are the lipids, followed by proteins and finally, the DNA, which is more protected against damage [42]. Increased lipid peroxidation, assessed by the plasma MDA levels have been reported at the end of pregnancy in women with preeclampsia [9,10]. Furthermore, increased levels of carbonyls (a biomarker of protein oxidative damage), have also been reported in the placenta [43] and in plasma [9]. However, these studies have been conducted at the end of pregnancy when preeclampsia has already been diagnosed. It has been pointed out that the presence of a potential oxidative damage marker when a disease is already established, does not ensure that the molecule is a predictive biomarker, since it can be the consequence of the disease itself [24]. Based on the above mentioned relationship between MDA and carbonyl levels with placental insufficiency, we postulated the possibility that they can also be early biomarkers of the disease, and serve as diagnostic tools of pregnancy complications. However, in the present study, conducted in healthy pregnant women, MDA or carbonyl plasma levels were not elevated in women who later developed a complication. Therefore, we can conclude that oxidized proteins or lipids do not seem to be early biomarkers of obstetric complications. It is unlikely that DNA oxidation products would be an early marker, since DNA undergoes oxidation later than lipids and proteins [42].

The other factor implicated in oxidative stress is the level of antioxidants. In fact, oxidative damage found in preeclampsia has been suggested to be related to an insufficient capacity of endogenous antioxidants to counteract ROS elevation [43,44]. Adequate levels of antioxidants might be particularly important around 10<sup>th</sup>–12<sup>th</sup> week of pregnancy when ROS exhibit a large increase, due to the burst of oxygen in the placenta [11]. We found that individual plasma antioxidants tended to be lower in women who developed a maternal complication, but we did not find a statistical difference in any of the measured biomarkers. The complex nature of redox reactions makes difficult to ascribe a prominent role to a particular antioxidant. Therefore, the use of a score integrating several biomarkers has been proposed as a better tool to address oxidative status of an individual, particularly in human populations with high variability [25]. Using a similar approach we found that Antiox-S—a global score integrating all plasma antioxidants—was significantly

lower in women who developed a pregnancy complication, suggesting that this global parameter could be a potential predictive tool to assess pregnancy complications.

ART might also be related to alterations in oxidative status, as demonstrated by the reduction of several serum antioxidants after an *in vitro* fertilization cycle [45]. Therefore, we considered important to investigate the relationship between ART and maternal oxidative status at the end of the first trimester. We found that Antiox-S tended to be lower in ART pregnancies, but it did not reach statistical difference. Therefore, our data do not provide evidence for a negative input of the use of ART on global antioxidant status once pregnancy has been established.

We also found of interest to assess the levels of melatonin, a hormone acting as a direct ROS scavenger and also stimulating other endogenous antioxidants [16], which has gradually gained attention in the field of pregnancy. Recent data indicate that melatonin is a key hormone for successful gestation [13,18] and reduces placental oxidative stress in pregnancy complications [18,19]. We did not find statistical differences in melatonin levels between normal and complicated pregnancies. There was a tendency towards lower melatonin levels in women using ART, but did not reach statistical significance. However, it has to be taken into account that they were older and this hormone decreases with age. Furthermore, we have only addressed diurnal melatonin, due to ethical reasons and it is possible that nocturnal levels might have yielded different results. Despite the fact that we failed to find a significant alteration in melatonin levels at 10 weeks of gestation in women who developed an obstetric complication, the negative relationship between melatonin and carbonyl levels suggests a possible protective effect of this hormone against protein oxidative damage in pregnancy.

The diet is an important modulator of human health and diets rich in foods of vegetable origin have demonstrated several benefits. For example, consumption during periconceptual period of a mediterranean diet—rich in fruits, vegetables and cereals—reduces the risk of hypertension-related pregnancy disorders [21]. Fruits and vegetables are the major source of antioxidants in the diet, particularly phenolic compounds and vitamins [20]. Therefore we considered of interest to determine their contribution to plasma

antioxidant status. We did not find statistical differences in fruit and vegetable consumption comparing women with normal or complicated pregnancy. However, using a multiple correspondence analysis, we detected that a high consumption of foods of vegetable origin cluster with high plasma levels of phenolic compounds and also with high Antiox-S score. The lack of significant differences among groups might be related to the fact that the majority of the women included in the study had a moderate-high fruit and vegetable consumption, as expected from a mediterranean-style diet pattern. We also found that a high milk consumption (daily intake) associate with high levels of melatonin and low levels of carbonyl groups. This association might be related to the milk content in tryptophan, which is the precursor of melatonin [22]. Therefore, we suggest that diet-derived antioxidants might be important in the regulation of antioxidant status and diets rich in foods of vegetable origin are desirable in pregnancy, particularly if endogenous antioxidant systems are deficient.

In conclusion, the present data indicate that the development of pregnancy complications is associated with a low global antioxidant status in early gestation, independent of the use of ART. This might be related to a deficient increase in endogenous antioxidant systems during a critical period of rapid ROS elevation. Our data also suggest that the global antioxidant status may be modulated through the diet and, therefore, nutritional education programs for pregnant woman should be emphasized. An important outcome of the study is the use of a global score, calculated from individual plasma biomarkers, which is a more powerful tool to assess global antioxidant status. Larger population studies will allow establishing the utility of Antiox-S or similar scores as predictive tool of pregnancy complications.

#### Conflict of interest statement

The authors report no conflict of interest.

#### Authors contributions

David Ramiro-Cortijo, experimental procedures (plasma antioxidants and carbonyl groups), inclusion of experimental data on data base, interpretation of data.

Teresa Herrera, experimental procedures (melatonin and polyphenols), inclusion of experimental data on data base.

Pilar Rodríguez-Rodríguez, experimental procedures (plasma antioxidants).

Ángel L. López de Pablo, project design, experimental design and data interpretation on oxidative stress parameters.

María de la Calle, project design, pregnant women inclusion in the study, obstetric data collection, data interpretation.

M. Rosario López Giménez, project design, design of questionnaires and data base, statistical interpretation.

Ana I. Mora-Urda, clinical data collection and inclusion in data base.

Perla Y. Gutiérrez-Arzapalo, blood sample collection and processing.

Rubén Gómez-Rioja, organization of blood sample collection, clinical biochemical data.

Yolanda Aguilera, experimental procedures (polyphenols), interpretation of data.

María Ángeles Martín-Cabrejas, project design, experimental design and interpretation of data on melatonin and polyphenols.

Luis Condezo-Hoyos, experimental design and adaptation of micro methods of oxidative stress.

M. Carmen González, project design, data interpretation oxidative stress.

Pilar Montero, project design, design of nutrition questionnaires

and data interpretation.

Bernardo Moreno-Jiménez, project design, social questionnaires, project funding and organization.

Silvia M. Arribas, project design, interpretation of data, manuscript writing.

#### Acknowledgements

This work was supported by Universidad Autónoma de Madrid; Multidisciplinary Research Project (CEMU, 2013–10) and Ministerio de Economía y Competitividad (FEM2012-37634-C03-01 and FEM2015-63631-R).

#### References

- [1] M. Luque, Evolución del riesgo de mortalidad fetal tardía, prematuridad y bajo peso al nacer asociado a la edad materna en España, *Gac. Sanit.* 2008 (22) (1996–2005) 396–403.
- [2] STATISTICS ABO., Year Book Australia, Australian Bureau of Statistics, Canberra, 2007.
- [3] S.J. Ventura, J.C. Abma, W.D. Mosher, S.K. Henshaw, Estimated pregnancy rates for the United States, 1990–2005: an update, *Natl. Vital Stat. Rep.* 58 (2009) 1–14.
- [4] M. Carolan, D. Frankowska, Advanced maternal age and adverse perinatal outcome: a review of the evidence, *Midwifery* 27 (2011) 793–801.
- [5] A. Tarrade, P. Panchenko, C. Junien, A. Gabory, Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism, *J. Exp. Biol.* 218 (2015) 50–58.
- [6] P. Wu, C. van den Berg, Z. Alfrevic, S. O'Brien, M. Röthlisberger, P.N. Baker, L.C. Kenny, K. Kublickiene, J.J. Duvekot, Early pregnancy biomarkers in preeclampsia: a systematic review and meta-analysis, *Int. J. Mol. Sci.* 16 (2015) 23035–23056.
- [7] Z. Zhao, K.H. Moley, A.M. Gronowski, Diagnostic potential for miRNAs as biomarkers for pregnancy-specific diseases, *Clin. Biochem.* 46 (2013) 953–960.
- [8] A. Agarwal, A. Aponte-Mellado, B.J. Premkumar, A. Shaman, S. Gupta, The effects of oxidative stress on female reproduction: a review, *Reprod. Biol. Endocrinol.* 10 (2012), 49–7827-10-49.
- [9] F. Bernardi, F. Guolo, T. Bortolin, F. Petronilho, F. Dal-Pizzol, Oxidative stress and inflammatory markers in normal pregnancy and preeclampsia, *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 34 (2008) 948–951.
- [10] H. Orhan, L. Onderoglu, A. Yücel, G. Sahin, Circulating biomarkers of oxidative stress in complicated pregnancies, *Arch. Gynecol. Obstet.* 267 (2003) 189–195.
- [11] E. Jauniaux, A.L. Watson, J. Hempstock, Y. Bao, J.N. Skepper, G.J. Burton, Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress: a possible factor in human early pregnancy failure, *Am. J. Pathol.* 157 (2000) 2111–2122.
- [12] F. Wu, F. Tian, Y. Lin, W. Xu, Oxidative stress: placenta function and dysfunction, *Am. J. Reprod. Immunol.* (2015) 1–14, <http://dx.doi.org/10.1111/aji.12454>.
- [13] L. Sagrillo-Fagundes, A. Soliman, C. Vaillancourt, Maternal and placental melatonin: actions and implication for successful pregnancies, *Minerva Ginecol.* 66 (2014) 251–266.
- [14] A. Soliman, A. Lacasse, D. Lanoix, L. Sagrillo-Fagundes, V. Boulard, C. Vaillancourt, Placental melatonin system is present throughout pregnancy and regulates villous trophoblast differentiation, *J. Pineal Res.* 59 (2015) 38–46.
- [15] Y. Chen, J. Sheen, M. Tiao, Y. Tain, L. Huang, Roles of melatonin in fetal programming in compromised pregnancies, *Int. J. Mol. Sci.* 14 (2013) 5380–5401.
- [16] C. Rodríguez, J.C. Mayo, R.M. Sainz, I. Antolin, F. Herrera, V. Martín, R.J. Reiter, Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin, *J. Pineal Res.* 36 (2004) 1–9.
- [17] H. Tamura, A. Takasaki, T. Taketani, M. Tanabe, L. Lee, I. Tamura, R. Maekawa, H. Aasada, Y. Yamagata, N. Sugino, Melatonin and female reproduction, *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 40 (2014) 1–11.
- [18] L. Marseglia, G. D'Angelo, S. Manti, R.J. Reiter, E. Gitto, Potential utility of melatonin in preeclampsia, intrauterine fetal growth retardation, and perinatal asphyxia, *Reprod. Sci.* 23 (8) (2016) 970–977.
- [19] H. Tamura, Y. Nakamura, M.P. Terron, L.J. Flores, L.C. Manchester, D. Tan, N. Sugino, R.J. Reiter, Melatonin and pregnancy in the human, *Reprod. Toxicol.* 25 (2008) 291–303.
- [20] N. Balasundram, K. Sundram, S. Samman, Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses, *Food Chem.* 99 (2006) 191–203.
- [21] D.A. Schoemaker, S.S. Soedamah-Muthu, L.K. Callaway, G.D. Mishra, Prepregnancy dietary patterns and risk of developing hypertensive disorders of pregnancy: results from the Australian Longitudinal Study on Women's Health, *Am. J. Clin. Nutr.* 102 (2015) 94–101.
- [22] K. Peuhkuri, N. Sihvola, R. Korpela, Dietary factors and fluctuating levels of melatonin, *Food & Nutr. Res.* (2012) 56.

- [23] M. Iriti, E.M. Varoni, S. Vitalini, Melatonin in traditional Mediterranean diets, *J. Pineal Res.* 49 (2010) 101–105.
- [24] B. Halliwell, *Free radicals and other reactive species in disease*, eLS, 2005, <http://dx.doi.org/10.1002/047001590X>.
- [25] F. Veglia, V. Cavalca, E. Tremoli, OXY-SCORE: a global index to improve evaluation of oxidative stress by combining pro- and antioxidant markers, in: *Advanced Protocols in Oxidative Stress II*, Springer, 2010, pp. 197–213.
- [26] L. Condezo-Hoyos, M. Rubio, S.M. Arribas, G. España-Caparrós, P. Rodríguez-Rodríguez, E. Mujica-Pacheco, M.C. González, A plasma oxidative stress global index in early stages of chronic venous insufficiency, *J. Vasc. Surg.* 57 (2013) 205–213.
- [27] G. Ruiz-Hurtado, L. Condezo-Hoyos, H. Pulido-Olmo, I. Aranguéz, M. Del Carmen González, S. Arribas, C. Cerezo, J. Segura, M. Praga, M.S. Fernández-Alfonso, L.M. Ruilope, Development of albuminuria and enhancement of oxidative stress during chronic renin-angiotensin system suppression, *J. Hypertens.* 32 (2014) 2082–2091 discussion 2091.
- [28] P. Rodríguez-Rodríguez, Angel Luis López de Pablo, L. Condezo-Hoyos, M.A. Martín-Cabrejas, Y. Aguilera, G. Ruiz-Hurtado, P.Y. Gutierrez-Arzapalo, D. Ramiro-Cortijo, M.S. Fernández-Alfonso, M. del Carmen González, Fetal undernutrition is associated with perinatal sex-dependent alterations in oxidative status, *J. Nutr. Biochem.* 26 (2015) 1650–1659.
- [29] C.L. Hawkins, P.E. Morgan, M.J. Davies, Quantification of protein modification by oxidants, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 965–988.
- [30] T. Berkban, P. Boonprom, S. Bunbupha, J.U. Welbat, U. Kukongviriyapan, V. Kukongviriyapan, P. Pakdeechote, P. Prachaney, Ellagic acid prevents L-NAME-induced hypertension via restoration of eNOS and p47phox expression in rats, *Nutrients* 7 (2015) 5265–5280.
- [31] Z. Jia, S. Saha, H. Zhu, Y. Li, H. Misra, Spectrofluorometric measurement of reduced glutathione levels in human neuronal cells, *Methods Redox Signal* (2010) 235–237.
- [32] L. Saleh, C. Plieth, Total low-molecular-weight antioxidants as a summary parameter, quantified in biological samples by a chemiluminescence inhibition assay, *Nat. Protoc.* 5 (2010) 1627–1634.
- [33] V.L. Singleton, R. Orthofer, R.M. Lamuela-Raventos, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent, *Meth. Enzymol.* 299 (1999) 152–178.
- [34] Instituto Nacional de Estadística, *Movimiento Natural de la Población e Indicadores Demográficos Básicos*, INE, 2013.
- [35] P.T. Ellison, *Advances in human reproductive ecology*, *Annu. Rev. Anthropol.* (1994) 255–275.
- [36] G. Bréart, H. Barros, Y. Wagener, S. Prati, Characteristics of the childbearing population in Europe, *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 111 (2003) S45–S52.
- [37] *Estadísticas de empleo*, Eurostat, 2015.
- [38] A. Ferrara, Increasing prevalence of gestational diabetes mellitus: a public health perspective, *Diabetes Care* 30 (Suppl 2) (2007) S141–S146.
- [39] L. Duley, S. Meher, E. Abalos, Management of pre-eclampsia, *Br. Med. J.* 7539 (2006) 463.
- [40] B. Sibai, G. Dekker, M. Kupferminc, Pre-eclampsia, *Lancet* 365 (2005) 785–799.
- [41] C. Bamberg, C. Fotopoulou, P. Neissner, T. Slowinski, J.W. Dudenhausen, H. Proquitté, C. Bühler, W. Henrich, Maternal characteristics and twin gestation outcomes over 10 years: impact of conception methods, *Fertil. Steril.* 98 (2012) 95–101 e1.
- [42] D. Ortuno-Sahagun, M. Pallas, A.E. Rojas-Mayorquin, Oxidative stress in aging: advances in proteomic approaches, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2014 (2014) 573208.
- [43] P. Zusterzeel, H. Rütten, H. Roelofs, W. Peters, E. Steegers, Protein carbonyls in decidua and placenta of pre-eclamptic women as markers for oxidative stress, *Placenta* 22 (2001) 213–219.
- [44] E. Llurba, E. Gratacós, P. Martín-Gallán, L. Cabero, C. Domínguez, A comprehensive study of oxidative stress and antioxidant status in pre-eclampsia and normal pregnancy, *Free Radic. Biol. Med.* 37 (2004) 557–570.
- [45] I. Aurrekoetxea, J.I. Ruiz-Sanz, A.R. del Agua, R. Navarro, M.L. Hernández, R. Matorras, B. Prieto, M.B. Ruiz-Larrea, Serum oxidizability and antioxidant status in patients undergoing in vitro fertilization, *Fertil. Steril.* 94 (2010) 1279–1286.

---

# Fetal Undernutrition and Oxidative Stress: Influence of Sex and Gender

David Ramiro-Cortijo, Pilar Rodríguez-Rodríguez,  
Ángel L. López de Pablo, M<sup>a</sup> Rosario López-Giménez,  
M<sup>a</sup> Carmen González, and Silvia M. Arribas

---

## Abstract

Low birth weight is increasing worldwide. In poor societies, this is linked to maternal undernutrition and in high-income countries it is mainly due to gestational complications associated with the delay in first pregnancy. In both situations, the consequence is fetal undernutrition and deficient growth. In addition to the high risk of perinatal mortality and morbidity, low birth weight has long-term health consequences, increasing the risk of cardiometabolic disease development. The process that associates a deficient fetal growth with a higher risk of adult disease is known as fetal programming. In addition to undernutrition, other stress factors during intrauterine life – such as exposure to toxic substances – also contribute to programming. All of them are known to disrupt the physiological systems responsible for cardiovascular and metabolic control, being oxidative stress a common denominator. Fetal responses to stress factors seem to be modulated by sex. Under adverse intrauterine conditions, females exhibit a better placental adaptation and fetal growth. Later on, during fertile life, estrogens also represent a biological advantage for females, due to their cardiovascular protective actions. However, gender-related factors, such as social or cultural inequities, are likely to counteract the better biological adaptation of females. Sex and gender

---

David Ramiro-Cortijo and Pilar Rodríguez-Rodríguez contributed equally to this work.

D. Ramiro-Cortijo • P. Rodríguez-Rodríguez • Á.L. López de Pablo • M.C. González • S.M. Arribas (✉)

Department of Physiology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain  
e-mail: [david.ramiro@uam.es](mailto:david.ramiro@uam.es); [pilar.rodriguezr@uam.es](mailto:pilar.rodriguezr@uam.es); [angel.lopezdepablo@uam.es](mailto:angel.lopezdepablo@uam.es); [m.c.gonzalez@uam.es](mailto:m.c.gonzalez@uam.es); [silvia.arribas@uam.es](mailto:silvia.arribas@uam.es)

M.R. López-Giménez

Department of Preventive Medicine, Public Health and Microbiology, Faculty of Medicine, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain  
e-mail: [mrosario.lopez@uam.es](mailto:mrosario.lopez@uam.es)

are often difficult to separate and their relative influence in fetal programming is still far from being understood. Additional research is needed to design-specific interventions and policies in order to reduce the impact of fetal programming on cardiometabolic health in future generations.

### Keywords

Antioxidants • Cardiometabolic diseases • Fetal programming • Gender • Malnutrition • Oxidative stress • Placenta • Sex

### List of Abbreviations

BMI	Body Mass Index
CMD	Cardiometabolic disease
CVD	Cardiovascular disease
GPX	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
GSH	Reduced Glutathione
HPA	Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis
IUGR	Intrauterine growth restriction
LBW	Low birth weight
MDA	Malondialdehyde
NO	Nitric oxide
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosterone system
RNS	Reactive nitrogen species
ROS	Reactive oxygen species
SNS	Sympathetic nervous system
SOD	Superoxide dismutase
T2DM	Type 2 Diabetes Mellitus

## Contents

Introduction .....	3
Fetal Programming: Stress Factors and Mechanisms Implicated .....	3
Oxidative Stress as Mechanism Implicated in Fetal Programming .....	6
Reactive Species and Antioxidants .....	7
Biomarkers to Assess Oxidative Stress in Biological Samples .....	7
Oxidative Stress and Fetal Programming .....	9
Influence of Sex and Gender in Fetal Programming .....	9
Sex Influences .....	9
Gender Influences .....	11
Policies and Protocols .....	15
Low- and Middle-Income Countries .....	15
High-Income Countries .....	15
Dictionary of Terms .....	15
Summary Points .....	16
References .....	17

## Introduction

Over 20 million low birth weight (LBW) babies are born every year, related to intrauterine growth retardation (IUGR), prematurity, and other causes, and the rate is growing worldwide (World Health Organization 2014). The incidence of LBW is much higher in poor societies, but is also increasing in high-income countries. LBW not only contributes to neonatal morbidity and mortality, but also predisposes to long-term noncommunicable diseases, a process known as fetal programming. In particular, LBW associates with cardiovascular diseases and their risk factors – hypertension, obesity, and type II Diabetes Mellitus (T2DM) – referred in this chapter as cardiometabolic diseases (CMD).

LBW is mainly the result of fetal undernutrition related either to a poor maternal diet or to placental complications. However, factors such as exposure to toxic substances or psychological stress may also contribute. All these fetal stressors seem to converge on the same organic alterations – oxidative stress being a common underlying mechanism. In addition, the sex of the individual seems to modulate the responses to fetal stressor and may exert an influence on CMD development. Furthermore, gender aspects, including social and educational factors, might also modulated fetal programming.

The aim of this chapter is to summarize current knowledge on the role of oxidative stress in fetal programming with a focus on the influence of sex and gender.

---

## Fetal Programming: Stress Factors and Mechanisms Implicated

Intrauterine life is a period of high plasticity, the individual being highly vulnerable to stress factors – particularly nutritional limitations. Over four decades of study have provided sufficient evidence of the relationship between fetal stress, LBW, and CMD. This association was postulated by Barker, based on epidemiological studies in populations that suffered starvation in early twentieth century (Forsdahl 1977; Barker and Osmond 1986).

Barker's hypothesis has been extensively confirmed in populations of different ethnic origin and geographical location exposed to malnutrition in fetal life, which exhibited an increased risk of hypertension, T2DM, and obesity in adult life (Alexander et al. 2015; Liu et al. 2016). Postnatal growth acceleration following inadequate fetal growth has an additional negative impact, further contributing to CMD programming (Singhal and Lucas 2004).

The main stress factors interfering with fetal growth are maternal malnutrition, obstetric complications, exposure to toxic substances, and psychological stress.

Although the term “malnutrition” is often used as synonym of undernutrition, it can also be used to indicate a dietary imbalance or excess. Maternal undernutrition was the first recognized stress factor responsible for LBW and CMD programming, and continues to be the most important contributor. More than 4.5% of pregnant women worldwide suffer undernutrition, mainly in low- and middle-income



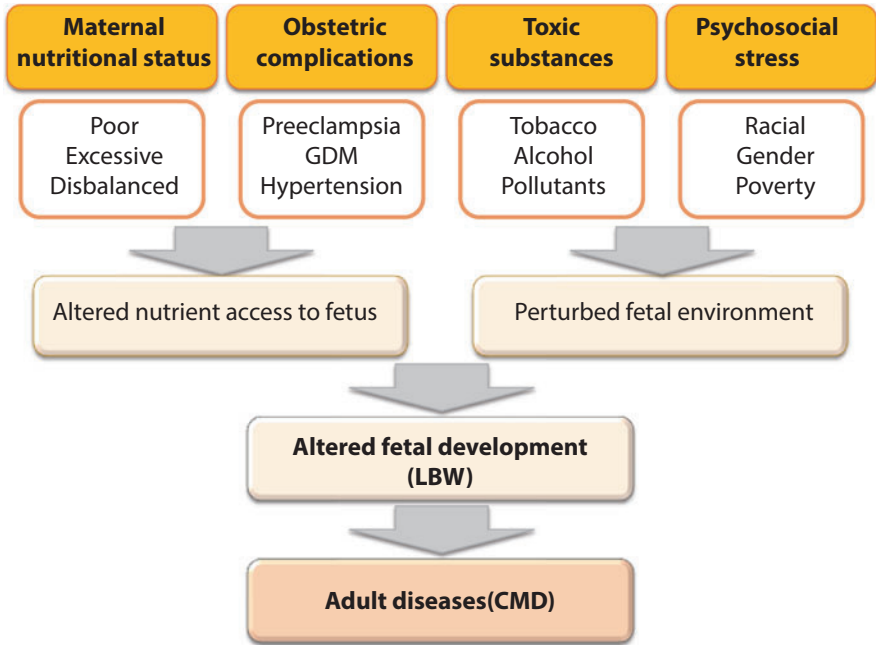
countries (Yasmin 2016). Furthermore, micronutrient-deficient diets are also common and also contribute to LBW and prematurity (Black et al. 2013). Pregnant women from high-income countries might also have micronutrient deficiency due to unbalanced diets related to lifestyle factors. Another form of malnutrition is obesity, which is a worldwide growing problem. It has been estimated that around 57% of pregnant women are overweight, which is also a risk factor for LBW (Tarrade et al. 2015).

Fetal undernutrition might also be a consequence of obstetric complications, such as gestational diabetes mellitus (GDM) and preeclampsia, unrelated to the maternal nutritional status. These complications contribute to LBW by restricting nutrient and oxygen availability to the fetus and are associated with CMD programming (Boney et al. 2005).

Some toxic substances related to lifestyle habits, like tobacco and alcohol intake, interfere with fetal growth, increase the risk of LBW (Ko et al. 2014; Nykjaer et al. 2014), and program hypertension (Simonetti et al. 2011). It is remarkable that alcohol intake has negative effects on fetal growth not only when consumed during pregnancy, but also during the period prior to conception and women should be advised when planning to conceive (Nykjaer et al. 2014). Similarly, some environmental contaminants, which are difficult to evade due to their ubiquitous presence, interfere with fetal development and might program CMD (Al-Gubory 2016).

Other substances known to interfere with fetal growth are glucocorticoids and, in particular, cortisol, which might be elevated in the mother as a consequence of pharmacological treatment or psychological stress (Alexander et al. 2015). The passage of cortisol from the mother to the fetus is limited by the placental enzyme 11- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase-2 (11- $\beta$ -HSD-2). In situations of undernutrition, placental insufficiency, or maternal exposure to toxic substances, this enzyme is inhibited, allowing cortisol to reach the fetus in excess and, therefore, contributing to LBW. Epidemiological studies provide evidence that cortisol elevation might contribute to LBW and cardiovascular disease in adult life (Van Montfort et al. 2005). A schematic diagram summarizing the main fetal stress factors is shown in Fig. 1.

Studies in animals mimicking gestational complications, exposure to malnutrition, toxic substances, or excess cortisol during intrauterine life, confirm that these stressors lead to LBW and subsequent CMD. These studies have also investigated the mechanisms through which an adverse fetal environment translates into physiological alterations, demonstrating that different fetal stressors converge onto similar alterations in the systems responsible for cardiometabolic control (Nuyt 2008; Alexander et al. 2015). Thus, studies in animal models of fetal programming reveal a deficient kidney, heart, and vascular development, evidenced as low organ weight and cell number at birth. These initial alterations are associated with later insufficient renal function, cardiac hypertrophy, and arterial stiffening – factors contributing to hypertension development in adult life (Alexander et al. 2015; Rodríguez-Rodríguez et al. 2017). Fetal programming of hypertension has also been associated with alterations in the renin-angiotensin-aldosterone and the sympathetic nervous systems (RAAS; SNS), which are key for blood pressure regulation (Alexander et al. 2015).

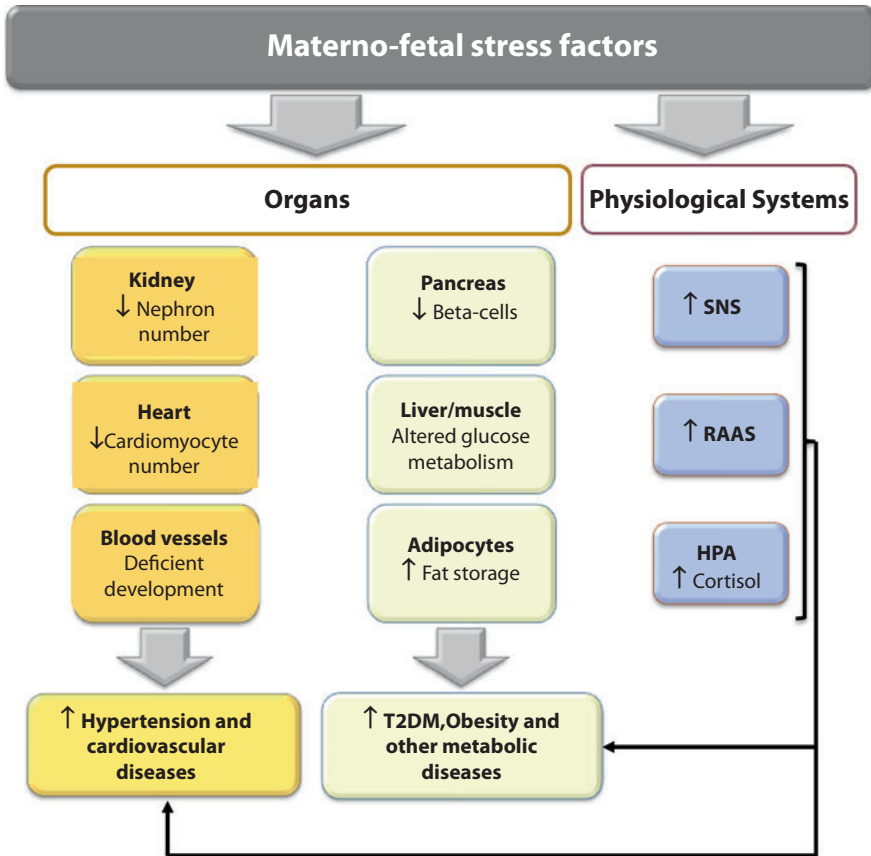


**Fig. 1 Main stress factors implicated in fetal programming of cardiometabolic disease.** Adverse factors known to interfere with fetal growth contributing to low birth (*LBW*), and subsequent development of cardiometabolic diseases (*CMD*) in adult life. *GDM* Gestational Diabetes Mellitus

Regarding the organs responsible for metabolic control, alterations in fetal pancreatic  $\beta$ -cells, adipocytes, skeletal muscle, and liver have been found in animals exposed to fetal stress factors. These initial alterations have been associated with abnormal control of glucose and fat metabolism and the subsequent development of T2DM and obesity in adult life.

Some of the aforementioned alterations might be mediated by epigenetic processes, i.e., the modification in gene function and expression without changes in the DNA sequence. Several fetal stress factors seem to alter the expression of important genes for cardiometabolic control, including 11 $\beta$ -HSD2, several RAAS components, and some glucose transporters – through epigenetic modulation (Ingelfinger and Nuyt 2012; Alexander et al. 2015). Epigenetic changes are inheritable, and thus, *CMD* programming can be transmitted from one generation to the other. Figure 2 summarizes the main alterations induced by fetal stressors in organ growth and physiological systems responsible for cardiometabolic control.





**Fig. 2** Alterations implicated in fetal programming of cardiometabolic diseases. Stress factors during fetal life lead to cardiometabolic diseases, such as hypertension, type 2 diabetes mellitus (*T2DM*), and obesity, through modifications in several organs and physiological systems such as the sympathetic nervous system (*SNS*), the renin-angiotensin-aldosterone system (*RAAS*), and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis (*HPA*)

### Oxidative Stress as Mechanism Implicated in Fetal Programming

Oxidative stress can be defined as an imbalance between pro-oxidative substances (reactive species) and antioxidants, favoring the former.

Oxidative stress is well known to contribute to kidney, heart, and vascular pathophysiological alterations associated with CMD diseases through oxidative damage to macromolecules. Therefore, it is plausible that oxidative stress may be the underlying common link between adverse fetal environment and increased risk of CMD (Thompson and Al-Hasan 2012; Alexander et al. 2015).

## Reactive Species and Antioxidants

Biologically relevant reactive species includes reactive oxygen species (ROS) – generated as a consequence of aerobic metabolism – and reactive nitrogen species (RNS) which can be either free radicals or nonradical species. Their common characteristic is their high instability. Thus, reactive species have a tendency to react with surrounding molecules, thereby oxidizing them. ROS and RNS have important physiological functions as cell signaling molecules and in the immune defense, among others. However, in excess, they produce oxidative damage to lipids, proteins, and DNA, resulting in functional loss (Halliwell and Gutteridge 2015; Nikolaidis et al. 2015).

The main cellular ROS are superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) and derived molecules, such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) and hydroxyl radical ( $OH^{\bullet}$ ). Biologically relevant RNS include nitric oxide (NO) and peroxynitrite ( $ONOO^-$ ).

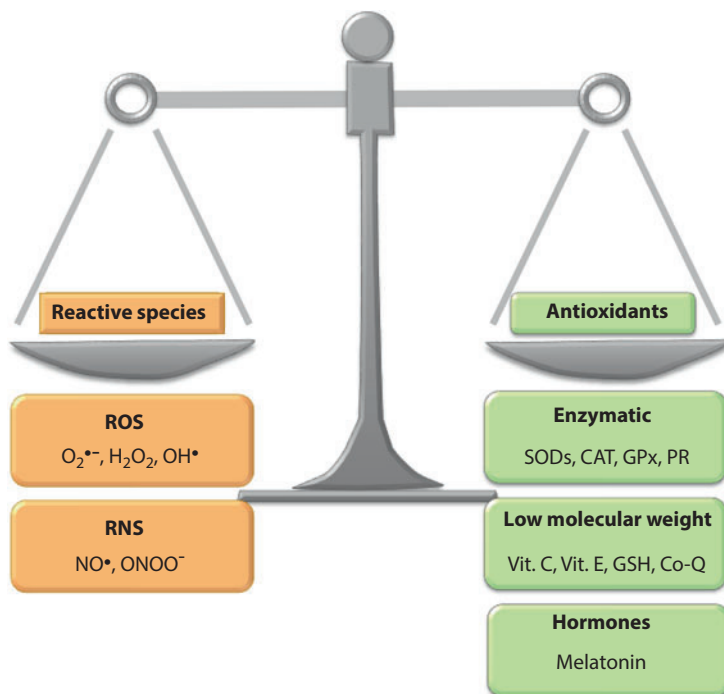
To counteract the high oxidative capacity of reactive species, the organisms display a well-organized endogenous antioxidant system. From a wide point of view, an antioxidant can be defined as a substance that delays, prevents, or removes oxidative damage to target molecules. Endogenous antioxidants can be enzymatic systems, low molecular weight molecules, and the hormone melatonin (Reiter et al. 2016).

Figure 3 shows a schematic diagram of biologically relevant reactive species and antioxidants contributing to redox balance.

## Biomarkers to Assess Oxidative Stress in Biological Samples

Oxidative stress is considered an important mechanism in diseases and its assessment, through biomarkers present in accessible biological samples, provides important information for disease diagnosis and progression. However, this is not an easy target and the question on which biomarker is most suitable remains under debate. To evaluate oxidative stress, it would be desirable to have information on the levels of both reactive species and antioxidants, which represent the two sides of the balance. While the majority of endogenous antioxidants can be easily measured, reactive species are difficult to assess due to their short half-life.

Oxidative stress is frequently determined by the products of the oxidative damage to lipids, proteins and DNA. Lipids are the first target of oxidation by reactive species, altering cell membrane function, and lipid peroxidation products are frequently used to assess their damage. Protein oxidation by reactive species alters the function of key physiological molecules such as antibodies, enzymes, or receptors. Carbonyl groups in proteins are highly susceptible for oxidation and they are frequently used to assess the degree of protein damage. DNA oxidation occurs continuously in cells, but it is usually followed by repair. However, if the repair process is overwhelmed, cell mutation or death might occur. DNA oxidative damage can be assessed in plasma and urine by several biomarkers (Nikolaidis et al. 2015).



**Fig. 3 Pro-oxidant/antioxidant balance in biological systems.** Main biological pro-oxidant (reactive species) and antioxidant substances that are balanced in physiological situations. A pro-oxidant excess or an antioxidant deficiency induces a disbalance known as oxidative stress. Reactive species include Reactive Oxygen Species (*ROS*) and Reactive Nitrogen Species (*RNS*). The main biological ROS are superoxide anion ( $O_2^{\bullet-}$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), and hydroxyl radical ( $OH^{\bullet}$ ). The main RNS are nitric oxide ( $NO^{\bullet}$ ) and peroxynitrite ( $ONOO^-$ ). Endogenous antioxidants include the enzymatic systems superoxide dismutases (*SODs*), catalase (*CAT*), glutathione peroxidase (*GPx*) and peroxiredoxins (*PR*), several vitamins (*Vit.*), reduced glutathione (*GSH*) and coenzyme Q (*Co-Q*), and the hormone Melatonin

An elevation in these biomarkers over normal levels is indicative of oxidative stress. However, it does not identify the origin, i.e., an increase in reactive species, a decrease in antioxidants, or both. Further information can be obtained by evaluating antioxidants, which can be assessed in biological fluids. There are many endogenous antioxidants with different chemical characteristics and the assessment of a particular one does not provide sufficient information about the global antioxidant status. Therefore, it would be desirable to quantify as many antioxidants as possible. A better approach is to combine all antioxidants measured into an index, a parameter representative of the global antioxidant status of the individual. The use of an antioxidant index might be useful to predict obstetric and fetal complications (Ramiro-Cortijo et al. 2016).

---

## Oxidative Stress and Fetal Programming

There is wide evidence supporting the implication of oxidative stress in fetal programming. Different stress factors, including malnutrition (Gupta et al. 2004), nicotine (Stone et al. 2014), environmental pollutants (Al-Gubory 2016), or glucocorticoids (Stark et al. 2011), have been shown to associate with increased oxidative damage, measured both in pregnant women and in the offspring. The implication of oxidative stress in fetal programming is reinforced by the demonstration in animals that maternal exposure to fetal stress factors during gestation together with an antioxidant treatment avoids hypertension development in the offspring (Alexander et al. 2015).

Oxidative damage may be related to poor antioxidant levels during gestation, as found in neonates with growth deficiency and their mothers (Saker et al. 2008). Antioxidant deficiency can be a consequence of deficient passage of antioxidants through the placenta, particularly important during the last weeks of pregnancy (Davis and Auten 2010). However, oxidative disbalance may also occur in the first trimester of pregnancy and has been associated with higher risk of obstetric complications and deficient fetal growth (Potdar et al. 2009; Ramiro-Cortijo et al. 2016). The finding that low antioxidant levels in maternal plasma during gestation associate with diets poor in fruits and vegetables suggests the importance of maternal nutrition and micronutrients in particular for oxidative balance (Ramiro-Cortijo et al. 2016).

---

## Influence of Sex and Gender in Fetal Programming

Sex and gender are terms which are often exchanged, but have specific meanings. Sex refers to the classification according to biological genetic differences and can be considered as fixed. Gender is used to distinguish the socio-cultural differences assigned to women and men, which vary with time and among societies. Sex influences can be easily determined from studies in experimental animals using males and females. However, in humans, sex and gender are closely interrelated and their relative influence is difficult to separate.

Despite growing evidence that human diseases present a sexual dimorphism in the prevalence, symptoms, and severity, sex and gender-based considerations are still not sufficiently taken into account in biomedical research or in clinical practice. In particular, their role in fetal programming is still not completely understood.

### Sex Influences

There is evidence that fetal programming of CMD exhibits a sexual dimorphism. Among the biological factors which contribute, the best characterized are the placenta and sex hormones. The majority of experimental animal studies conclude that males exposed to fetal stress exhibit a higher susceptibility to hypertension and cardiovascular diseases development than females (Dasinger and Alexander 2016).

However, in humans, sexual dimorphism is not evident and women and men who suffered starvation in utero exhibit similar CMD risk (Smith et al. 2016; Liu et al. 2016). The apparent discrepancy might be related to age influences, menopause being a possible confounding factor. This is supported by longitudinal studies using animals exposed to undernutrition during intrauterine life, which show that young females exhibit a better cardiovascular response compared to males. However, at old age females and males exhibit similar cardiovascular alterations (Rodríguez-Rodríguez et al. 2017). Interestingly, females seem to exhibit similar or even higher vulnerability than males in the development of CMD when the fetal stressor is overnutrition or nutritional disbalance (Alexander et al. 2015). Despite these findings, there is insufficient information on the long-term responses of females to fetal stress factors and an effort should be made to increase the number of studies to clarify the role of sex and age in fetal programming.

### **Role of the Placenta**

The placenta has endocrine, metabolic, and barrier functions and also participates in the suppression of maternal immunity against the fetus. When exposed to an insult, failure or inadequate placental response may contribute to alterations in fetal growth and subsequent disease programming.

The placenta is generated by the fetus and, therefore, has the same biological sex. Male and female placentas exhibit structural and molecular differences and respond differently to adverse stimuli. Female placenta seems to have a better buffering capacity against suboptimal nutrition (Eriksson et al. 2010; Tarrade et al. 2015; Rosenfeld 2015). However, in a situation of overnutrition, females seem to be at disadvantage and more prone to programming. This may explain why there is a larger prevalence of T2DM and strokes in women from obese mothers (Eriksson et al. 2014). Differences in genetic regulation between male and female placenta might also account for the better adaptation of females to fetal stress factors. Thus, female placenta are able to upregulate the enzymatic barrier 11 $\beta$ -HSD2 in response to excess glucocorticoid exposure, leading to a better adaptation than males against alterations in HPA axis (Rosenfeld 2015).

Sex differences in placental function may be related to oxidative stress. During gestation, there is an elevation of ROS, which play important physiological roles. Incapacity of the placenta to counteract this ROS elevation through a concomitant increase in antioxidants is a predisposing factor for maternal and fetal complications (Wu et al. 2015). Male and female placentas also respond differently to stressors which modify oxidative status. In male placentas glucocorticoids induce a pro-oxidant state, with a detrimental impact on placental function and fetal growth (Rosenfeld 2015). Among endogenous antioxidant systems, melatonin – which may be synthesized by the placenta – has been suggested to play a protective role in obstetric and fetal complications, reducing oxidative stress (Marseglia et al. 2016). Whether melatonin levels in the placenta are influenced by sex remains to be determined.

### **Role of Sex Hormones**

The abovementioned sexual dimorphism in the placenta may be related to the effect of sex hormones. In males, testicular development and synthesis of the sex hormone testosterone starts around week 6–8 of gestation. This period marks the difference with females, which will be mainly exposed to maternal female sex hormones, estrogen, and progesterone, during the gestational period. Male and female sex hormones have opposing influences on placental vasculature. While estrogens stimulate production of NO (a well-known vasodilator) and stimulate vascular development, testosterone has the opposite effects (Chinnathambi et al. 2013; Gopalakrishnan et al. 2016; Maliqueo et al. 2016). A deficient placental vasculature and inadequate vasodilatation would compromise fetoplacental blood flow leading to fetal undernutrition. This might explain why excess in maternal testosterone levels (which occur in some pathological situations) are associated with inadequate fetal growth (Palomba et al. 2013; Gopalakrishnan et al. 2016).

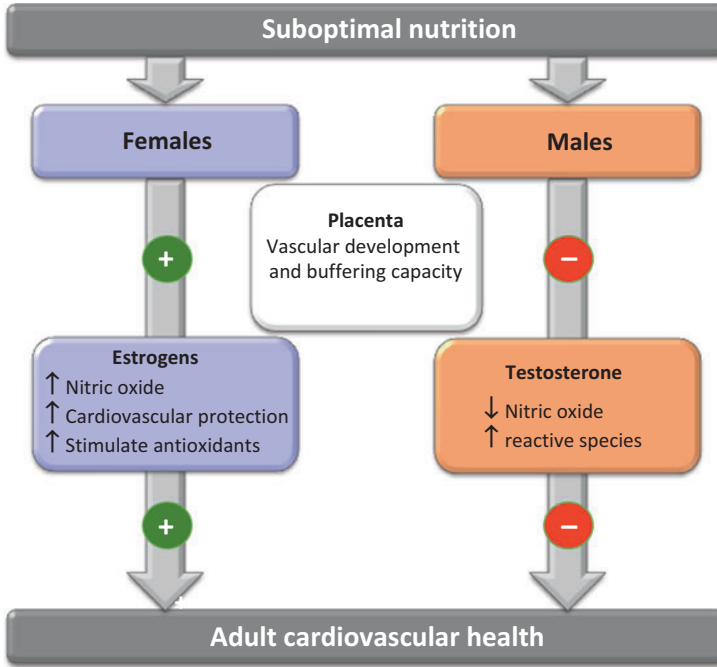
In adult life, estrogens and testosterone also exert opposing influences and it is well recognized that female sex hormones exhibit cardiovascular protective effects (Maric-Bilkan et al. 2014). Therefore, sex hormones could modulate the effects of fetal programming. The favorable effects of estrogens are supported by the fact that female animals exposed to a fetal stress usually do not exhibit high blood pressure, while males develop hypertension. Furthermore, ovariectomy induces blood pressure elevation, together with alterations in cardiovascular, RAAS, and renal systems, which are reversed by estrogen replacement. On the other hand, androgens seem to be implicated in fetal programming of hypertension, as suggested by the higher circulating testosterone levels in animals exposed to fetal stress and by the inhibition of hypertension development upon castration (Dasinger and Alexander 2016).

The effects of sex hormones may be related to oxidative stress. Estrogens stimulate antioxidant systems and inhibit ROS-producing enzymes, while testosterone activates ROS synthesis (Maric-Bilkan et al. 2014). Furthermore, in animal models of fetal stress, ovariectomy increases vascular ROS production (Dasinger and Alexander 2016).

Sex influences on fetal programming are summarized in Fig. 4.

### **Gender Influences**

Cardiovascular diseases have been perceived for many years as man's diseases (Lerner and Kannel 1986). This perception has been proved wrong and explained by a gender bias due to a combination of factors, such as the delay in women seeking medical care or the difficulties in the recognition of the clinical symptoms in women (Mosca et al. 2011). Moreover, epidemiological studies have focused on male-related cardiovascular risk factors, such as tobacco consumption excluding others (such as plasma triglycerides) which are more relevant in the prediction of cardiovascular events in women (Ridker et al. 2002). The importance of heart disease in women has been gradually recognized and substantial efforts have been made to reduce gender disparities in research and clinical care.



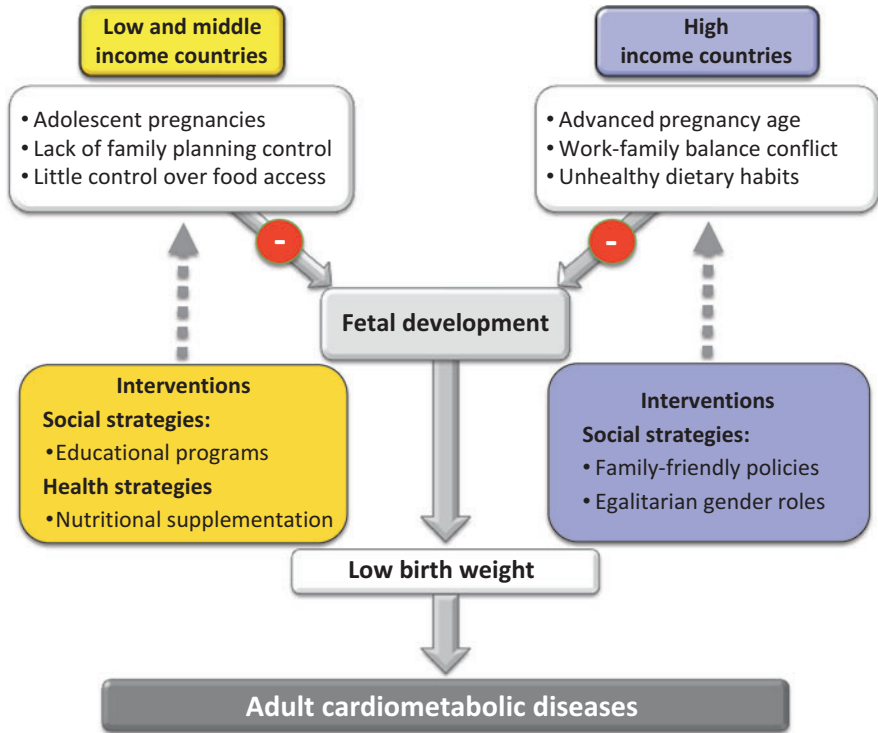
**Fig. 4 Sex influences on fetal programming of cardiovascular diseases.** Females are better adapted than males to suboptimal nutrition, both during fetal life, through placental adaptations, and during adult life through the cardiovascular protective actions of estrogens

Gender factors may also modulate some aspects of fetal development. Since social, cultural, and educational factors varies among different societies according to their economic status, their influence on fetal programming is separately analyzed in low- and high-income countries (Fig. 5).

### Gender Aspects in Low- and Middle-Income Countries

One of the gender-related factors, which may influence fetal programming in poor societies, is the lack of reproductive health and family planning control. Around 180 million pregnancies occur in low-income and only around 2 million in high-income countries. Moreover, one-third of the world pregnancies have not been planned in poor societies, in situations of chronic poverty, starvation, and deficient hygiene conditions. The immediate consequence is LBW. In fact, LBW has been estimated in approximately 20 million per year, the majority born in poor countries (World Health Organization 2014).

In situations of poverty, pregnant women are at higher risk of malnutrition, since gestation requires an increased intake of macro- and micronutrients to cover maternal and fetal needs. Gender aspects might contribute to maternal undernutrition in societies where women have a low social status and little decision-making power, particularly in rural settings. Furthermore, the poor educational level and taboos



**Fig. 5 Gender influences on fetal programming of cardiometabolic disease.** Contribution of gender factors to low birth weight and possible intervention strategies, according to socioeconomic development level

about food lead to inadequate dietary practices, further contributing to malnutrition and poor fetal development (Shannon et al. 2008). Even if maternal diet has sufficient macronutrients, micronutrient deficiencies are very common in developing countries, particularly iron (Black et al. 2013). Many micronutrients are cofactors of antioxidant enzymatic systems or are antioxidants themselves. Therefore, as stated in previous sections, deficiencies in vitamins and minerals might also contribute to fetal programming through oxidative stress.

A number of international initiatives have been taken to address the nutritional needs of women during periconceptional and gestational periods. A Cochrane database systematic review provides evidence that educational programs aimed at increasing energy intake in undernourished pregnant women reduces the risk of prematurity and LBW (Ota et al. 2015). Intervention strategies with micronutrient supplementation also demonstrate a reduction in LBW (Haider and Bhutta 2015) and an improvement of metabolic health of the offspring (Ekstrom et al. 2016). It has been put forward that educational programs should not only include pregnant women, but also engage other family members, particularly those with a high social role (Shannon et al. 2008).



In addition to maternal undernutrition, a second problem is pregnancy age. In low- and middle-income societies, it is not uncommon that the first pregnancy occurs in adolescence, which is an important developmental period. In this situation, nutrients have to cover the energy requirements for maternal and fetal growth and, in a situation of dietary deficiency, both would compete for nutrients, increasing the risk of LBW (Wemaux-Denis et al. 2017). This problem has been perceived by some authorities who have targeted adolescent girls as a priority group for nutritional intervention (Vogt et al. 2016).

### **Gender Aspects in High-Income Countries**

Developed societies are witnessing a progressive increase in the age of first pregnancy (Bréart et al. 2003; Ventura et al. 2009). The increase in maternity age is directly linked with a decline in fertility, which has increased the use of assisted reproduction techniques and multiple pregnancies, frequently associated with LBW and prematurity. Advanced pregnancy age also associates with obstetric complications, such as preeclampsia, gestational hypertension, or gestational diabetes, all linked to LBW. In high-income countries, these problems are not associated with perinatal mortality due to a better health care system. However, it is foreseen that, in future generations, the increase in the age of pregnancy will increase the incidence of CMD, through fetal programming (Tarrade et al. 2015).

The increase in maternity age in high-income countries is associated with the change in the social role of women and their gradual access to higher education and employment, as well as an increase in family planning control. Despite these social changes, in many developed societies egalitarian gender roles are not sufficiently developed and it is frequent that women experience a conflict between work and family, particularly in professionals of high educational background. This conflict has a direct influence on the decision to postpone maternity (Ramiro-Cortijo et al. 2016).

Another gender aspect is psychological stress derived from strenuous work, particularly in women with education and health-related jobs, where gender-specific difficulties arise and higher levels of burnout have been reported (Cassidy-Vu et al. 2017). Psychosocial stress by itself has adverse consequences for the fetus, through the effects of excess cortisol, increasing the risk of LBW and prematurity (Guardino et al. 2016). Furthermore, psychological stress might favor addictive behaviors such as tobacco or alcohol, as well as fast-food-based diets, poorer in micronutrients.

In summary, micronutrient deficiencies, obstetric complications, and psychological stress are likely to have a negative impact on oxidative balance, contributing to LBW and fetal programming of CMD. Regarding sex and gender influences, we conclude that although female sex seems to have a better biological adaptation to fetal stressors, gender inequities might counterbalance this advantage, leading to a similar risk of CMD development compared to men, or even higher after menopause. Therefore, specific nutritional interventions as well educational programs should be applied. In addition, it is desirable to increase social awareness to promote egalitarian gender roles.

---

## Policies and Protocols

**Governmental Policies** This chapter points out the importance of LBW as key factor in fetal programming of CMD. In low- and middle-income countries LBW is a direct consequence of maternal malnutrition, while obstetric complications due to increase in gestational age are the main determinants in high-income countries. Therefore, specific governmental policies aimed at counteracting these problems are required.

### Low- and Middle-Income Countries

- Educational programs involving not only pregnant women, but also key family figures, would help to spread good dietary practices during pregnancy.
- Adolescent girls should be targeted as a priority group for education on nutritional aspects during gestation.
- Supplementation programs with macro- and micronutrients would help to reduce the incidence of LBW and prematurity in vulnerable populations.

### High-Income Countries

- Health educational programs to raise awareness on the negative effects of alcohol and tobacco consumption on the gestational health, not only during pregnancy but also prior to conception.
- Specific governmental programs designed to extend maternity leave periods could have a positive impact on obstetric problems associated with maternity age delay.
- Specific guidelines could be designed to promote family-friendly practices at work.

In addition, environmental health policies should be applied worldwide in order to reduce toxic pollutants and their deleterious consequences on maternal and offspring health.

---

## Dictionary of Terms

Antioxidants	Substance that delay, prevent, or remove oxidative damage to molecules.
Epigenetic alterations	Heritable genetic modifications without changes in DNA sequence.
Intrauterine growth restriction (IUGR)	Refers to poor growth in utero evidenced by at least two ultrasound measurements.

---

Free Radicals	Molecules or fragments of molecules containing one or more unpaired electrons. Free radicals are highly unstable and tend to react with other molecules inducing oxidative processes.
Gender	Gender is used to distinguish the socio-cultural differences assigned to women and men, which vary with time and among societies.
Oxidative stress	Disbalance between pro-oxidant reactive species and antioxidants.
Prematurity	Broad term defining neonates born prior to 37 weeks' gestation.
Reactive species	Molecules or fragments of molecules which induce oxidation to macromolecules. Biologically relevant are those derived from oxygen (Reactive Oxygen Species, ROS) and nitrogen (Reactive Nitrogen Species, RNS)
Sex	Sex refers to the classification according to biological genetic differences between women and men.

---

## Summary Points

- LBW is increasing worldwide; in low-income countries due to maternal undernutrition and in high-income countries due to obstetric complications.
- In high-income countries, the increase in obstetric complications is associated with maternity age delay.
- Epidemiological and experimental studies support the negative impact of LBW due to undernutrition and other stress factors on CMD development in adult life.
- Fetal undernutrition and programming is likely to contribute to the burden of CMD in the future generations worldwide.
- Oxidative stress is implicated in the alterations in physiological systems associated with fetal programming of CMD.
- Female placenta has a better adaptation to suboptimal conditions in utero compared to male placenta.
- Female hormones might counteract fetal programming improving placental vascular development and protecting the cardiovascular system during adult life.
- Gender aspects may counteract the better biological adaptation of female sex to fetal stress factors.

- It is necessary to expand the knowledge on the mechanisms responsible for the sexual dimorphism in fetal programming, including females in experimental animal studies.
- The influence of sex and gender in fetal programming of CMD should be further investigated in epidemiological studies.

---

## References

- Al-Gubory KH (2016) Multiple exposures to environmental pollutants and oxidative stress: is there a sex specific risk of developmental complications for fetuses? *Birth Defects Res C Embryo Today* 108(4):351–364
- Alexander BT, Dasinger JH, Intapad S (2015) Fetal programming and cardiovascular pathology. *Compr Physiol*. doi:10.1002/cphy.c140036
- Barker DJ, Osmond C (1986) Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet* 327(8489):1077–1081
- Black RE, Victora CG, Walker SP, Bhutta ZA, Christian P, De Onis M, Ezzati M, Grantham-McGregor S, Katz J, Martorell R (2013) Maternal and child undernutrition and overweight in low-income and middle-income countries. *Lancet* 382(9890):427–451
- Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR (2005) Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 115(3):e290–e296
- Bréart G, Barros H, Wagener Y, Prati S (2003) Characteristics of the childbearing population in Europe. *Eur J Obstet Gynecol and Reprod Biol* 111:S45–S52
- Cassidy-Vu L, Beck K, Moore JB (2017) Burnout in female faculty members. *J Prim Care Community Health* 8(2):97–99
- Chinnathambi V, Balakrishnan M, Ramadoss J, Yallampalli C, Sathishkumar K (2013) Testosterone alters maternal vascular adaptations: role of the endothelial NO system. *Hypertension* 61(3):647–654
- Dasinger JH, Alexander BT (2016) Gender differences in developmental programming of cardiovascular diseases. *Clin Sci* 130(5):337–348
- Davis JM, Auten RL (2010) Maturation of the antioxidant system and the effects on preterm birth. *Semin Fetal Neonatal Med* 15(4):191–195. doi:10.1016/j.siny.2010.04.001
- Ekstrom EC, Lindstrom E, Raqib R, El Arifeen S, Basu S, Brismar K, Selling K, Persson LA (2016) Effects of prenatal micronutrient and early food supplementation on metabolic status of the offspring at 4.5 years of age. The MINIMat randomized trial in rural Bangladesh. *Int J Epidemiol* 45(5):1656–1667
- Eriksson JG, Kajantie E, Osmond C, Thornburg K, Barker DJ (2010) Boys live dangerously in the womb. *Am J Hum Biol* 22(3):330–335
- Eriksson JG, Sandboge S, Salonen MK, Kajantie E, Osmond C (2014) Long-term consequences of maternal overweight in pregnancy on offspring later health: findings from the Helsinki birth cohort study. *Ann Med* 46(6):434–438
- Forsdahl A (1977) Are poor living conditions in childhood and adolescence an important risk factor for arteriosclerotic heart disease? *Br J Prev Soc Med* 31(2):91–95
- Gopalakrishnan K, Mishra JS, Chinnathambi V, Vincent KL, Patrikeev I, Motamedi M, Saade GR, Hankins GD, Sathishkumar K (2016) Elevated testosterone reduces uterine blood flow, spiral artery elongation, and placental oxygenation in pregnant rats. *Hypertension* 67(3):630–639
- Guardino CM, Schetter CD, Saxbe DE, Adam EK, Ramey SL, Shalowitz MU (2016) Diurnal salivary cortisol patterns prior to pregnancy predict infant birth weight. *Health Psychol* 35(6):625
- Gupta P, Narang M, Banerjee B, Basu S (2004) Oxidative stress in term small for gestational age neonates born to undernourished mothers: a case control study. *BMC Pediatr* 4(1):14

- Haider BA, Bhutta ZA (2015) Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 11, Art. No.: CD004905
- Halliwell B, Gutteridge JM (2015) *Free radicals in biology and medicine*. Oxford University Press, New York
- Ingelfinger JR, Nuyt A (2012) Impact of fetal programming, birth weight, and infant feeding on later hypertension. *J Clin Hypertens* 14(6):365–371
- Ko T, Tsai L, Chu L, Yeh S, Leung C, Chen C, Chou H, Tsao P, Chen P, Hsieh W (2014) Parental smoking during pregnancy and its association with low birth weight, small for gestational age, and preterm birth offspring: a birth cohort study. *Pediatr Neonatol* 55(1):20–27
- Lerner DJ, Kannel WB (1986) Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J* 111(2):383–390
- Liu L, Pang Z, Sun J, Xue B, Wang S, Ning F, Qiao Q (2017) Exposure to famine in early life and the risk of obesity in adulthood in Qingdao: evidence from the 1959-1961 Chinese famine. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2:154–160
- Maliqueo M, Echiburú B, Crisosto N (2016) Sex steroids modulate uterine-placental vasculature: implications for obstetrics and neonatal outcomes. *Front Physiol* 7:152
- Maric-Bilkan C, Gilbert EL, Ryan MJ (2014) Impact of ovarian function on cardiovascular health in women: focus on hypertension. *Int J Womens Health* 6:131–139
- Marseglia L, D'Angelo G, Manti S, Reiter RJ, Gitto E (2016) Potential utility of melatonin in preeclampsia, intrauterine fetal growth retardation, and perinatal asphyxia. *Reprod Sci* 23(8):970–977
- Mosca L, Barrett-Connor E, Wenger NK (2011) Sex/gender differences in cardiovascular disease prevention: what a difference a decade makes. *Circulation* 124(19):2145–2154
- Nikolaidis MG, Margaritelis NV, Paschalis V, Theodorou AA, Kyparos A, Vrabas IS (2015) Common questions and tentative answers on how to assess oxidative stress after antioxidant supplementation and exercise. In: Lamprecht M (ed) *Antioxidants in sport nutrition*. Taylor & Francis Group, LLC, Boca Raton
- Nuyt AM (2008) Mechanisms underlying developmental programming of elevated blood pressure and vascular dysfunction: evidence from human studies and experimental animal models. *Clin Sci* 114(1):1–17
- Nykjaer C, Alwan NA, Greenwood DC, Simpson NA, Hay AW, White KL, Cade JE (2014) Maternal alcohol intake prior to and during pregnancy and risk of adverse birth outcomes: evidence from a British cohort. *J Epidemiol Community Health* 68(6):542–549
- Ota E, Hori H, Mori R, Tobe-Gai R, Farrar D (2015) Antenatal dietary education and supplementation to increase energy and protein intake. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, Issue 6, Art.No.: CD000032
- Palomba S, Russo T, Falbo A, Di Cello A, Tolino A, Tucci L, La Sala GB, Zullo F (2013) Macroscopic and microscopic findings of the placenta in women with polycystic ovary syndrome. *Hum Reprod* 28(10):2838–2847
- Potdar N, Singh R, Mistry V, Evans M, Farmer P, Konje J, Cooke M (2009) First-trimester increase in oxidative stress and risk of small-for-gestational-age fetus. *BJOG Int J Obstet Gynaecol* 116(5):637–642
- Ramiro-Cortijo D, Herrera T, Rodríguez-Rodríguez P, López De Pablo ÁL, De La Calle M, López-Giménez MR, Mora-Urda AI, Gutiérrez-Arzapalo PY, Gómez-Rioja R, Aguilera Y (2016) Maternal plasma antioxidant status in the first trimester of pregnancy and development of obstetric complications. *Placenta* 47:37–45
- Reiter RJ, Mayo JC, Tan D, Sainz RM, Alatorre-Jimenez M, Qin L (2016) Melatonin as an antioxidant: under promises but over delivers. *J Pineal Res* 61(3):253–278. doi:[10.1111/jpi.12360](https://doi.org/10.1111/jpi.12360)
- Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR (2002) Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med* 347(20):1557–1565

- Rodríguez-Rodríguez P, López de Pablo AL, García-Prieto CF, Somoza B, Quintana-Villamandos B, Gómez de Diego JJ, Gutiérrez-Arzapalo PY, Ramiro-Cortijo D, González MC, Arribas SM (2017) Long term effects of fetal undernutrition on rat heart. Role of hypertension and oxidative stress. *PLoS One* 12(2):e0171544
- Rosenfeld CS (2015) Sex-specific placental responses in fetal development. *Endocrinology* 156(10):3422–3434
- Saker M, Mokhtari NS, Merzouk SA, Merzouk H, Belarbi B, Narce M (2008) Oxidant and antioxidant status in mothers and their newborns according to birthweight. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 141(2):95–99
- Shannon K, Mahmud Z, Asfia A, Ali M (2008) The social and environmental factors underlying maternal malnutrition in rural Bangladesh: implications for reproductive health and nutrition programs. *Health Care Women Int* 29(8–9):826–840
- Simonetti GD, Schwertz R, Klett M, Hoffmann GF, Schaefer F, Wuhl E (2011) Determinants of blood pressure in preschool children: the role of parental smoking. *Circulation* 123(3):292–298
- Singhal A, Lucas A (2004) Early origins of cardiovascular disease: is there a unifying hypothesis? *Lancet* 363(9421):1642
- Smith C, Ryckman K, Barnabei V, Howard B, Isasi C, Sarto G, Tom S, Van Horn L, Wallace R, Robinson J (2016) The impact of birth weight on cardiovascular disease risk in the Women's Health Initiative. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 26(3):239–245
- Stark MJ, Hodyl NA, Wright IM, Clifton VL (2011) Influence of sex and glucocorticoid exposure on preterm placental pro-oxidant-antioxidant balance. *Placenta* 32(11):865–870
- Stone WL, Bailey B, Khraisha N (2014) The pathophysiology of smoking during pregnancy: a systems biology approach. *Front Biosci (Elite Ed)* 6:318–328
- Tarrade A, Panchenko P, Junien C, Gabory A (2015) Placental contribution to nutritional programming of health and diseases: epigenetics and sexual dimorphism. *J Exp Biol* 218(Pt 1):50–58
- Thompson LP, Al-Hasan Y (2012) Impact of oxidative stress in fetal programming. *J Pregnancy*. doi:10.1155/2012/582748
- Van Montfoort N, Finken MJ, le Cessie S, Dekker FW, Wit JM (2005) Could cortisol explain the association between birth weight and cardiovascular disease in later life? A meta-analysis. *Eur J Endocrinol* 153(6):811–817
- Ventura SJ, Abma JC, Mosher WD, Henshaw SK (2009) Estimated pregnancy rates for the United States, 1990–2005: an update. *Natl Vital Stat Rep* 58(4):1–14
- Vogt LE, Rukooko B, Iversen PO, Eide WB (2016) Human rights dimensions of food, health and care in children's homes in Kampala, Uganda – a qualitative study. *BMC Int Health Hum Rights* 16(1):10
- Wemaux-Denis C, Garabedian C, Huc A, Cailleret O, Depoortere MH, Hammou Y, Subtil D (2017) Pregnancy and delivery of teenagers: is the obstetrical prognosis worst between 13–15 years old? *Gynecol Obstet Fertil Senol* 45(1):5–8
- World Health Organization (2014) World Health Organization. Global targets 2025. To improve maternal, infant and young child nutrition. Available [www.who.int/nutrition/topics/nutrition](http://www.who.int/nutrition/topics/nutrition). Accessed 17 Oct 2014
- Wu F, Tian F, Lin Y, Xu W (2015) Oxidative stress: placenta function and dysfunction. *Am J Reprod Immunol* 76(4):258–271. doi:10.1111/aji.12454
- Yasmin HN (2016) Epidemiology of malnutrition: maternal and child malnutrition. *J Gynecol Neonatal Biol* 2:1–5