



**EFFECTOS ANTIHIPERCOLESTEROLÉMICOS DEL
ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN EL
EMBARAZO EN UN MODELO MURINO**

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER

ALBA BLANCO RUIZ



**EFFECTOS ANTIHIPERCOLESTEROLÉMICOS DEL ACEITE
DE OLIVA VIRGEN EXTRA EN EL EMBARAZO EN UN
MODELO MURINO**

Departamento de Fisiología

Máster Universitario en Fisiología y Neurociencia

Escuela Internacional de Posgrado

Universidad de Sevilla

Tiempo de Ejecución: diciembre 2022 a julio 2023.

Autora: Alba Blanco Ruiz

Tutor: Alfonso Mate Barrero

Cotutora: Andrea Alejandra Leiva Mendoza

Sevilla, 29 de junio de 2023.

AGRADECIMIENTOS

A Andrea Leiva por ser mi guía en todo momento, mostrar una entrega diaria y siempre tener una palabra bonita de aliento y ánimo. Gracias por tu alegría, empatía y comprensión en todo el proyecto. Por contagiarme el entusiasmo por la ciencia y demostrarme que con trabajo y fe las cosas salen adelante. Siempre te tendré una profunda admiración por lo que haces y transmites a las personas que tienes a tu alrededor.

Al alma del laboratorio de Fisiología, Álvaro Santana, Pablo Espinosa, Jaime Gutiérrez y Claudia Reyes por enseñarme siempre con pasión, paciencia y una buena sonrisa.

A los directores del laboratorio Alfonso Mate y Carmen Vázquez por darme la posibilidad de trabajar en el tema que me apasiona y hacer posible este trabajo.

A mis compañeros del Máster en Fisiología y Neurociencia, Edelweiss, Julio, Diego, Javi Ojalvo, Isa, Dani, Ignacio, Ana, Javi Muñoz, por coincidir, que no es fácil, ser un apoyo durante este año y hacer de un simple picnic después de un seminario el plan más divertido del mundo. Estoy segura de que nos quedan mil aventuras más juntos.

A mis incondicionales Valeria, David, Manuel y Julia por escucharme y estar ahí siempre que levanto la mano y llevarme al fin del mundo si el objetivo es sacarme una sonrisa.

A mis padres y mi hermano por apoyarme de manera incondicional en cada oportunidad que hace que me brillen los ojos, y aun sin saber de qué se trata, guiarme para conseguirlo.

Os quiero mucho.

Y como siempre digo, El cansancio es temporal, la satisfacción es para siempre.

RESUMEN

El presente Trabajo Fin de Máster de carácter experimental se basa en un modelo murino para estudiar un posible tratamiento frente a la dislipidemia en el embarazo. La dislipidemia es uno de los principales factores de riesgo en la enfermedad cardiovascular, que se mantiene como la primera causa de muerte en el mundo. El aumento en los niveles fisiológicos de colesterol por encima del 50 – 80 % genera en la mujer embarazada una *condición hipercolesterolémica suprafisiológica* o MSPH (*Maternal Supraphysiological Hypercholesterolemia*). Debido a la inexistencia de tratamientos no teratogénicos, actualmente no se incluye en la práctica clínica habitual un seguimiento del colesterol, triglicéridos o LDL en las mujeres embarazadas MSPH. En este trabajo se evalúa, en un modelo experimental murino con MSPH, una posible intervención nutricional con aceite de oliva virgen extra (AOVE) con el fin de mejorar el perfil lipídico y revertir la disfunción vascular observada en dicho modelo animal, con el fin último de extrapolarlo a las mujeres embarazadas.

Palabras clave: embarazo, hipercolesterolemia, disfunción endotelial, AOVE, óxido nítrico.

ABSTRACT

This experimental Master's Degree Final Project is based on a murine model to study a potential treatment for dyslipidemia in pregnancy. Dyslipidemia is one of the main risk factors in cardiovascular disease, which remains the leading cause of death worldwide. The increase in physiological levels of cholesterol by more than 50-80 % generates a condition in pregnant women, known as Maternal Supraphysiological Hypercholesterolemia (MSPH). Due to the lack of non-teratogenic treatments, cholesterol, triglycerides, or LDL monitoring is currently not included in routine clinical practice for MSPH pregnant women. In this study, we evaluate a possible nutritional intervention using extra virgin olive oil (EVOO) in a murine experimental model with MSPH, in order to improve the lipid profile and reverse the vascular dysfunction observed in the animal model, with the ultimate objective of extrapolating the findings to pregnant women.

Keywords: pregnancy, hypercholesterolemia, endothelial dysfunction, EVOO, nitric oxide.

ÍNDICE

1. ANTECEDENTES	1
1.1 Enfermedad cardiovascular	1
1.2 Programación fetal.....	1
1.3 Función vascular y disfunción endotelial	3
1.4 Abordaje clínico de la condición MSPH	5
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	7
2.1 Hipótesis	7
2.2 Objetivos.....	7
3. MATERIAL Y MÉTODOS	8
3.1 Ámbito de estudio.....	8
3.2 Reactivos	8
3.3 Descripción de la dieta administrada a los animales	8
3.4 Descripción del modelo animal	9
3.5 Obtención de muestras biológicas	10
3.6 Determinaciones séricas	10
3.7 Técnica de reactividad vascular.....	10
3.7.1 Estudio de la función vascular de la aorta.....	11
3.7.2 Curvas de contracción y relajación	12
3.7.2.1 Curva de fenilefrina.....	12
3.7.2.2 Curva de metacolina.....	13
3.7.2.3 Vasodilatación en respuesta a nitroprusiato sódico.....	14
3.8 Análisis estadísticos.....	14
4. RESULTADOS	15
4.1 Estudio de la variación de peso de los ratones	15
4.2 Efectos del AOVE sobre el perfil lipídico en un modelo animal de hipercolesterolemia	
16	
4.2.1 Evaluación de colesterol total	16
4.2.2 Evaluación de triglicéridos totales	17
4.3 Ensayos de reactividad vascular	18
4.3.1 Valores de circunferencia interna en aorta.....	18
4.3.2 Contracción vascular frente a KCl	19
4.3.3 Curva dosis-respuesta frente a fenilefrina.....	20
4.3.4 Curva dosis-respuesta frente a metacolina.....	21
4.3.5 Curva dosis-respuesta frente a SNP	22
5. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS	24
6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA	29

1. ANTECEDENTES

1.1 Enfermedad cardiovascular

Según la Organización Mundial de la Salud (who.int), la enfermedad cardiovascular (ECV) es la primera causa de muerte en el mundo (26,9 %). Entre los principales factores de riesgo asociados se encuentra la dislipidemia, asociada principalmente a niveles elevados de colesterol y LDL (Cuevas M. and Alonso K, 2016). Para un correcto desarrollo fetal, el colesterol total y el LDL aumentan sobre un 20-35 % durante el embarazo, por lo que este aumento se considera fisiológico; sin embargo, en algunas mujeres, este aumento va más allá del 50-80 %. En la actualidad, quienes padecen esta condición desconocen que los niveles lipídicos no son monitoreados durante el desarrollo del embarazo (Leiva et al., 2013). Aún más, los obstetras que deciden revisarlo no cuentan con una posible estrategia terapéutica para tratar esta dislipidemia durante esta etapa del ciclo vital, ya que los fármacos habituales hipolipemiantes, como las estatinas, están contraindicados en el embarazo (Mauri et al., 2021).

1.2 Programación fetal

La hipótesis del «origen fetal de la enfermedad del adulto», conocida como programación fetal, propone que ciertos estímulos que ocurren en etapas críticas o sensibles del desarrollo fetal cambian permanentemente la estructura, fisiología y metabolismo en el nuevo individuo en desarrollo, lo que predispone al desarrollo de enfermedades en la vida adulta (Palinski and NAPOLI, 2002; Thornburg et al., 2016). Es ampliamente conocida la importancia del embarazo para la programación fetal, sobre todo en patologías obstétricas como preeclampsia, diabetes gestacional, obesidad o restricción del crecimiento intrauterino. Así, la diabetes materna, la obesidad y la insuficiencia placentaria durante el embarazo están fuertemente asociadas con un aumento del riesgo en el recién nacido de desarrollar a largo plazo diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares (**Figura 1**) (Moreno Villares, 2016).

Un desorden obstétrico menos descrito que los anteriores es la hipercolesterolemia asociada al embarazo. Si los niveles de colesterol en el embarazo aumentan más allá del límite considerado fisiológico en esta condición, la hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia maternas durante este periodo del ciclo vital se correlaciona con disfunción endotelial fetoplacentaria, mayor estrés oxidativo en la circulación materna y fetal y lesiones ateroscleróticas en arterias fetales (Fuenzalida et al., 2018).

Como se ha comentado, durante el embarazo, las mujeres sufren un aumento fisiológico del colesterol total y LDL a nivel plasmático. Este fenómeno se conoce como hipercolesterolemia fisiológica materna del embarazo (*MPH, Maternal Physiological Hypercholesterolemia*) y se considera una respuesta adaptativa para satisfacer la creciente demanda de lípidos por parte del feto (Palinski, 2009). Los niveles de colesterol total en plasma en un embarazo a término de las mujeres MPH son ≤ 280 mg/dL, lo que supone aproximadamente un 35 % por encima de los niveles previos al embarazo. Por otra parte, el aumento del colesterol total materno durante el embarazo por encima de los niveles de MPH se define como hipercolesterolemia suprafisiológica materna (*MSPH, Maternal Supraphysiological Hypercholesterolemia*). En esta condición materna, los niveles maternos de colesterol total en un embarazo a término son > 280 mg/dL, pudiendo llegar a un 70-80 % por encima de los niveles previos al embarazo. En los últimos años se ha descrito que la aparición de MSPH puede tener consecuencias vasculares en los hijos: disfunción endotelial fetoplacentaria, alteraciones en el tráfico placentario de colesterol, aumento de la formación de estrías grasas en la aorta fetal, mayor estrés oxidativo a nivel sistémico, lesiones ateroscleróticas en la infancia y mayor complejidad asociada a enfermedades cardiovasculares en la vida adulta (Fuenzalida et al., 2020; Leiva et al., 2016, 2015). Por ello, la aparición de MSPH se ha propuesto como un nuevo desorden asociado al embarazo, desorden que se asocia con programación fetal de enfermedades cardiovasculares. De esta forma, el control de los lípidos maternos podría ser importante para la prevención de enfermedades cardiovasculares en hijos de embarazadas MSPH. Por otra parte, la función de las lipoproteínas está alterada en mujeres MSPH, alteraciones que se asocian con un mayor perfil prooxidante, lo que a su vez podría relacionarse directamente con las alteraciones vasculares ya descritas (Cantin et al., 2022).

Desafortunadamente, esta información no es suficiente para ser utilizada por el cuerpo médico y, hasta la fecha, la condición MSPH es desconocida ya que el sistema sanitario no mide los niveles de colesterol en los controles rutinarios del embarazo. Uno de los principales factores por lo que los médicos no lo controlan, es por las escasas herramientas con las que podrían ayudar a las mujeres MSPH en términos de tratamiento.

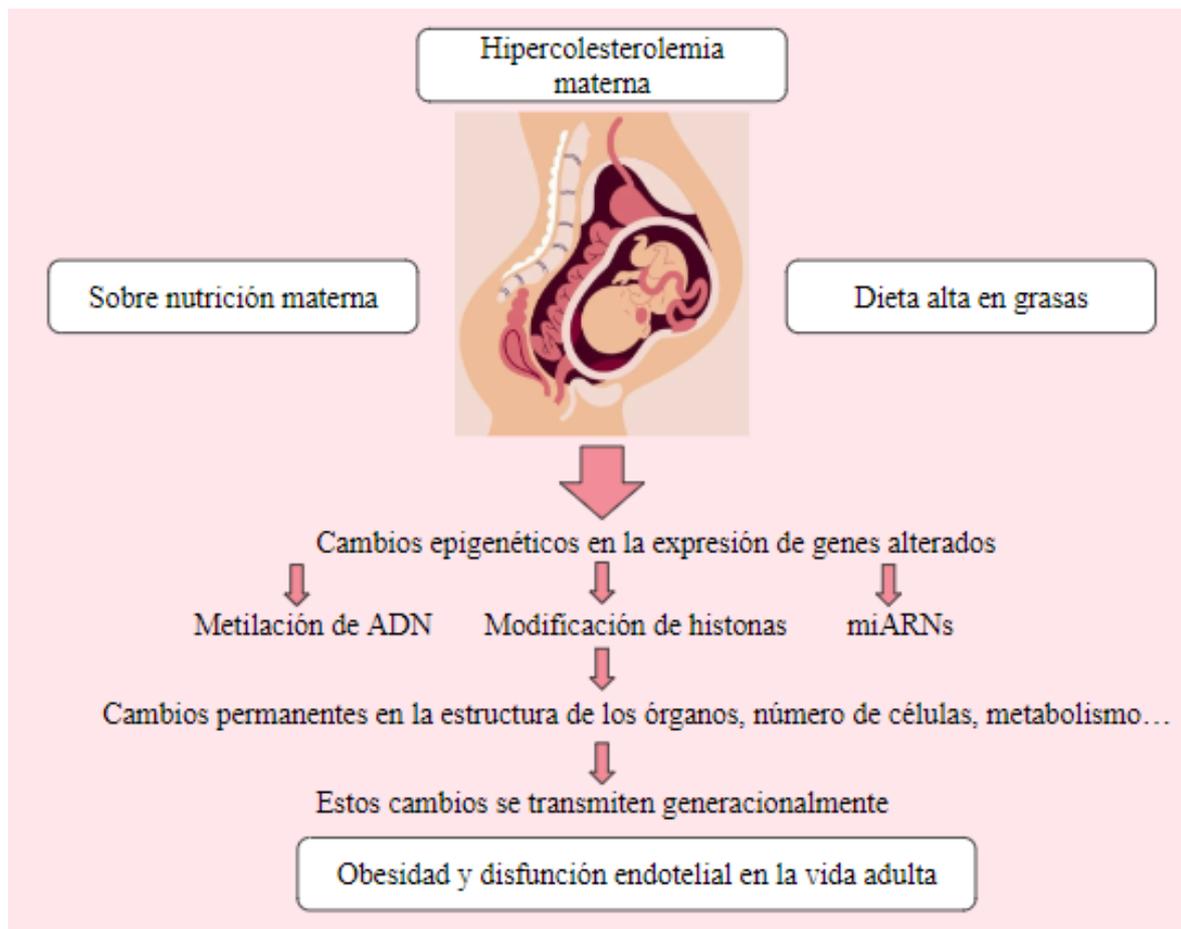


Figura 1. Representación esquemática de la programación fetal asociada a la enfermedad de hipercolesterolemia suprafisiológica humana.

1.3 Función vascular y disfunción endotelial

Uno de los primeros eventos fisiopatológicos asociados al desarrollo de ECVs es la disfunción vascular. Una correcta función vascular es importante para suministrar oxígeno y nutrientes a todos los órganos y tejidos del organismo, incluyendo en su función el equilibrio de los líquidos corporales y la eliminación de los desechos. Su disfunción puede comprometer a más de un sistema corporal al mismo tiempo, afectando principalmente a las arterias y/o las venas, al flujo sanguíneo mediante el debilitamiento de los vasos o dañando las válvulas.

Uno de los eventos iniciales en la disfunción vascular es la disfunción endotelial, que se caracteriza principalmente por la pérdida de la integridad fisiológica de las células endoteliales, la disminución de la producción y la sensibilidad al óxido nítrico (NO), lo que en última instancia da como resultado un desequilibrio en la homeostasis vascular que conduce a una pared de los vasos sanguíneos protrombótica, proinflamatoria y menos distensible (**Figura**

2). La vía de señalización del NO es el principal mecanismo molecular que desempeña un papel central en el mantenimiento de la homeostasis vascular, siendo este un gas soluble con fuertes propiedades vasodilatadoras, antiinflamatorias y antioxidantes que se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina por acción de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). El NO ejerce estas funciones sobre el endotelio vascular, que es una monocapa de células epiteliales especializadas que forman la interfaz entre las células del músculo liso y la luz de los vasos sanguíneos (Cyr et al., 2020).

En términos de disfunción endotelial, se ha descrito en vasos sanguíneos de la placenta y del cordón umbilical de embarazos MSPH una alteración de la vía L-arginina/NO a nivel endotelial. Se ha demostrado también que la condición MSPH se asocia no solo con afectación de esta vía, sino también con un desequilibrio en la otra enzima que compite con eNOS por su sustrato, la enzima arginasa. Las células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) poseen transportadores de aminoácidos catiónicos humanos, como hCAT-1, que favorecen el ingreso a la célula de la L-arginina (Sáez et al., 2023). Así, en MSPH se ha descrito menor actividad de la eNOS y mayor de arginasas, lo que se traduce en una menor síntesis de NO y una disminución evidente en sus efectos. Mediante experimentos de reactividad vascular se ha podido confirmar la presencia de disfunción endotelial en este contexto en vasos sanguíneos de la placenta y el cordón umbilical, que tienen alterada su capacidad de relajación en respuesta a agentes vasodilatadores dependiente del endotelio (Leiva 2013; 2016, Fuenzalida 2018).

Resumiendo, el colesterol circulante materno elevado es un factor importante asociado a la disfunción endotelial materna y fetal, lo que puede tener graves consecuencias en la salud de ambos individuos, predisponiendo al desarrollo de aterosclerosis y enfermedad cardiovascular (Leiva et al., 2013).

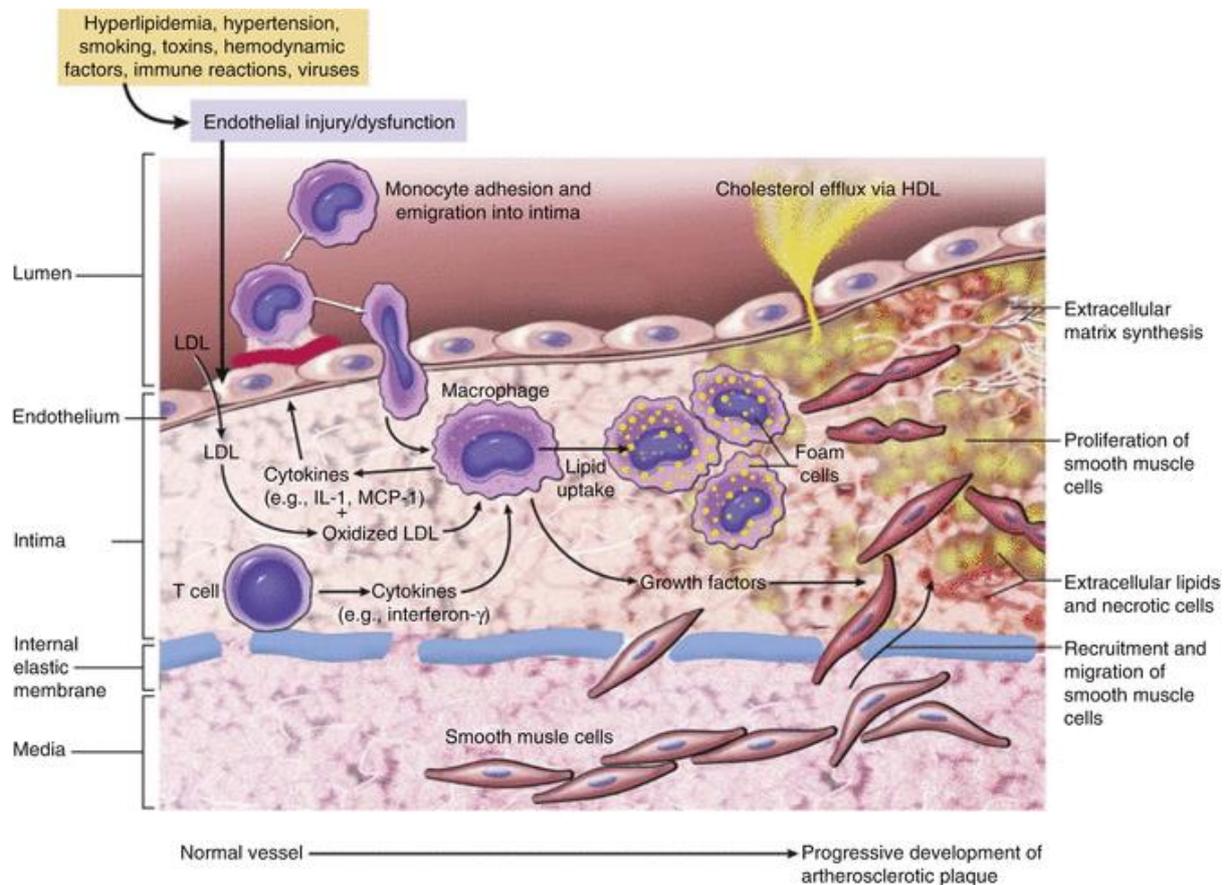


Figura 2. Representación esquemática del proceso fisiológico de disfunción endotelial asociado a eventos de hipercolesterolemia. Elsevier. Kumar et al: Robbins Basic Pathology 8e – www.studentconsult.com.

1.4 Abordaje clínico de la condición MSPH

En la población general, la dislipidemia se controla habitualmente con la familia de fármacos llamados estatinas. Sin embargo, en el caso de mujeres embarazadas este tratamiento no puede utilizarse por su potencial teratogénico, es decir, pueden causar defectos congénitos en los fetos.

La nutrición materna es un factor importante que contribuye a un entorno favorable para el desarrollo de la descendencia y para el control de la vida temprana, por lo que se ha propuesto que intervenciones nutricionales podrían tener efectos positivos sobre la salud materna y fetal.

Estudios recientes en modelos murinos y en grupos multicéntricos de pacientes no embarazados han demostrado que la intervención dietética mediante una alimentación muy rica en antioxidantes, la llamada dieta mediterránea (y, más concretamente, uno de sus principales componentes, el aceite de oliva virgen extra (AOVE)), no solo mejoran el perfil oxidativo en

pacientes cardiovasculares, sino que además disminuye el riesgo cardiovascular, lo que se asocia a una mejor función de las lipoproteínas HDL y a una menor oxidación y aterogenicidad de las lipoproteínas LDL (Jimenez-Torres et al., 2021; Yubero-Serrano et al., 2020). Esta función se atribuye principalmente a los polifenoles contenidos en el AOVE, compuestos con una actividad relevante para la salud del ser humano (Romani et al., 2019).

La suplementación con AOVE ha sido evaluada en mujeres embarazadas con patologías frecuentes como la diabetes gestacional, y se ha descrito que los parámetros oxidativos en la madre mejoran, lo que se ha asociado también con una mejor salud fetal (Biagi et al., 2019; Crovetto et al., 2021; Gesteiro et al., 2015; Lorite Mingot et al., 2017; Yamashita et al., 2006).

Considerando que el AOVE tiene efectos sobre los lípidos séricos, que presenta múltiples beneficios antioxidantes y antiinflamatorios (Reyes-Goya et al., 2022; Santana-Garrido et al., 2021) y que esta intervención es segura en embarazadas con otras patologías, proponemos evaluar en un modelo animal de MSPH el efecto de la administración de AOVE en dos ventanas de tiempo para evaluar parámetros oxidativos y cardiovasculares en la madre y en las crías. De esta forma, el presente Trabajo de Fin de Máster propone evaluar una intervención nutricional en ratones gestantes con hipercolesterolemia, con el fin último de que podamos trasladar esta intervención a embarazadas humanas.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La suplementación con AOVE en un modelo murino de hipercolesterolemia del embarazo es capaz de mejorar la disfunción endotelial asociada a esta condición.

2.2 Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es evaluar la función endotelial y el perfil lipídico en modelos murinos con hipercolesterolemia durante la etapa final del embarazo, después de la administración de una dieta rica en AOVE en dos ventanas de tiempo.

Concretamente, se persiguen los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1: Establecer un modelo de hipercolesterolemia durante la etapa final del embarazo en ratones c57BL/6.

Objetivo 2: Estudiar los efectos del AOVE sobre el perfil lipídico en el modelo animal de hipercolesterolemia durante la etapa final del embarazo.

Objetivo 3: Estudiar, mediante ensayos de reactividad vascular en la aorta materna, los efectos del AOVE sobre la función endotelial en el modelo animal de hipercolesterolemia durante la etapa final del embarazo.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Ámbito de estudio

El trabajo experimental que se detalla a continuación se realizó entre los meses de diciembre y mayo del curso 2022 – 2023, en el laboratorio del grupo de investigación *Fisiopatología Cardiovascular* del Departamento de Fisiología, en la Facultad de Farmacia.

3.2 Reactivos

- Bicarbonato sódico (NaHCO_3), Sigma-Aldrich. Art. S5761
- Cloruro cálcico (CaCl_2), Sigma-Aldrich. Art. C3881
- Cloruro potásico (KCl), PanReac AppliChem. Art. A2939
- Cloruro sódico (NaCl), PanReac AppliChem. Art. 131659
- D- Glucosa, PanReac AppliChem. Art. A3666
- di-Potasio hidrógeno fosfato anhidro, Panreac AppliChem. Art. 121512
- Fenilefrina (hidrocloruro), Sigma-Aldrich. Art. P6126
- Nitroprusiato sódico (SNP), Sigma-Aldrich. Art. 717778
- Metacolina (cloruro), Sigma-Aldrich. Art. PHR-19431G
- PBS (Phosphate-buffered saline), Sigma-Aldrich, Art. P4417
- Potasio dihidrogenofosfato anhidro (KH_2SO_4), PanReac AppliChem. Art.
- Sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4), PanReac AppliChem. Art. 212486
- Kit para determinación de colesterol, Spinreact MD41021
- Kit para determinación de triglicéridos, Spinreact MD41031

3.3 Descripción de la dieta administrada a los animales

Para la elaboración de las dietas se han utilizado dos tipos de pienso comercial (Panlab, S.L.): un pienso estándar de mantenimiento para ratón, y un pienso con alto contenido en colesterol (que contiene 2 % de colesterol y 0,5 % de ácido cólico). En los grupos experimentales sometidos a suplementación con aceite, ambos piensos fueron suplementados en nuestro laboratorio con 12 % de AOVE rico en polifenoles (380 mg/Kg, Varietal coratina, Alonso S.A, Chile), según se especifica a continuación. Para la elaboración de las 4 dietas utilizadas en nuestro estudio, los dos piensos comerciales (control y alto en colesterol) se trituraron en un molino eléctrico, pasando a continuación a la elaboración de pellets de aproximadamente 4 g y 1 cm³ con las siguientes características:

Dieta Control: Por cada 200 g de pienso control se añadieron 120 mL de H₂O, para conseguir una consistencia moldeable para la elaboración de los pellets del tamaño y peso indicados.

Dieta Colesterol: Por cada 200 g de pienso colesterol (colesterol 2 % y colato 0,5 %) se añadieron 120 mL de H₂O.

Dieta Colesterol-AOVE: Por cada 176 g de pienso colesterol se añadieron 120 mL de H₂O y 24 mL de AOVE (12 % peso/peso).

Dieta AOVE: Por cada 176 g de pienso control se añadieron 120 mL de H₂O y 24 mL de AOVE (12 % peso/peso).

3.4 Descripción del modelo animal

Para el desarrollo de este estudio se han utilizado ratones c57BL/6 de 8-12 semanas de edad procedentes del Centro de Experimentación Animal Óscar Pintado de la Universidad de Sevilla (CITIUS III). Los animales se estabularon en el animalario de la Facultad de Farmacia hasta la finalización de la intervención dietética. Las condiciones estándar de estabulación fueron 23 ± 1 °C, ciclos de 12 horas luz / 12 horas oscuridad, libre acceso al agua de bebida y alimentación *ad libitum*. Durante el estudio, todos los animales machos fueron alimentados con la dieta control. Los ratones se aparearon cruzando a las hembras durante la noche con un macho, y la presencia de un tapón mucoso vaginal a la mañana siguiente se designó como día de gestación 1. En el día 13 de gestación, las madres preñadas fueron aleatoriamente distribuidas en 4 grupos experimentales (n = 5 en cada grupo) con las especificidades dietéticas que se describen a continuación:

Grupo 1 (CT): hembras gestantes alimentadas con *Dieta Control* en todo momento. El día gestacional 18 (GD18) se llevó a cabo la eutanasia de los animales para obtener las muestras biológicas, como se describe más adelante.

Grupo 2 (HC): hembras gestantes alimentadas con *Dieta Control* hasta GD13. Seguidamente, desde GD13 hasta GD18 (momento de la eutanasia y obtención de muestras), los animales fueron alimentados con *Dieta Colesterol*. Este protocolo se ha establecido previamente como el adecuado para generar un modelo animal de hipercolesterolemia en etapas finales del embarazo y se ha propuesto que asemeja a la condición MSPH humana (Sáez et al., 2023).

Grupo 3 (HC-AOVE): hembras gestantes alimentadas con *Dieta Control* hasta GD13, pasando a *Dieta Colesterol-AOVE* desde GD13 hasta GD18 (eutanasia y obtención de muestras).

Grupo 4 (AOVE-HC-AOVE): hembras gestantes alimentadas durante tres semanas previas a la cruce con el macho y hasta GD13 con *Dieta AOVE*, pasando a *Dieta Colesterol-AOVE* desde GD13 hasta GD18 (eutanasia y obtención de muestras).

A lo largo del periodo experimental, se realizó un seguimiento de la evolución del peso corporal, control diario de ingesta de pienso y volumen de bebida ingerido.

3.5 Obtención de muestras biológicas

Los animales de experimentación fueron sacrificados mediante sobredosis de anestésico (isoflurano 5 %). Previo a la parada cardiorrespiratoria se procedió a la exanguinación del animal mediante punción cardiaca (para obtención de suero al centrifugar la sangre durante 15 min a 2000 g), realización de neumotórax y extracción de la aorta torácica. La aorta se mantuvo tras su extracción en solución Krebs-Henseleit (mM: 118,5 NaCl, 4,7 KCl, 25 NaHCO₃, 2,5 CaCl₂, 1,2 KH₂PO₄, 1,2 MgSO₄, y 11 D-Glucosa, pH 7.4) a 4°C para evitar la degradación del tejido, reducir la actividad metabólica y mantener la función endotelial. Posteriormente, se extirpó el tejido conectivo y adiposo que rodea a la arteria aorta y se cortaron anillos de 2 mm de longitud para los experimentos de reactividad vascular. Este proceso se realizó con tijeras de microcirugía tipo Vannas, bisturí y bajo una lupa.

3.6 Determinaciones séricas

Una vez obtenidas las muestras de suero de los animales, se llevó a cabo la determinación cuantitativa de los niveles séricos de colesterol total y triglicéridos totales. Estas determinaciones se llevaron a cabo mediante técnicas colorimétricas, en las que la intensidad del color obtenido es proporcional a la cantidad de producto presente en la muestra ensayada. En estos ensayos se usaron dos kits comerciales de la casa comercial *Spinreact*, utilizando 20 uL de suero de cada uno de los animales de experimentación.

3.7 Técnica de reactividad vascular

La reactividad vascular es una técnica clásica de fisiología vascular que se utiliza para medir la respuesta ante diferentes compuestos vasoactivos. En concreto, en este estudio se ha utilizado la técnica de miografía de alambre (**Figura 3**), que consiste en introducir un alambre

de un diámetro de 100 μm por el vaso de estudio con el objetivo de medir la tensión que en él se genera. Esta técnica se usa para estudiar las respuestas contráctiles de pequeñas arterias y permitiendo el monitoreo de la tensión isométrica del vaso. Esta tensión isométrica que desarrollan los vasos puede evaluarse en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos, fisiopatológicos y farmacológicos.

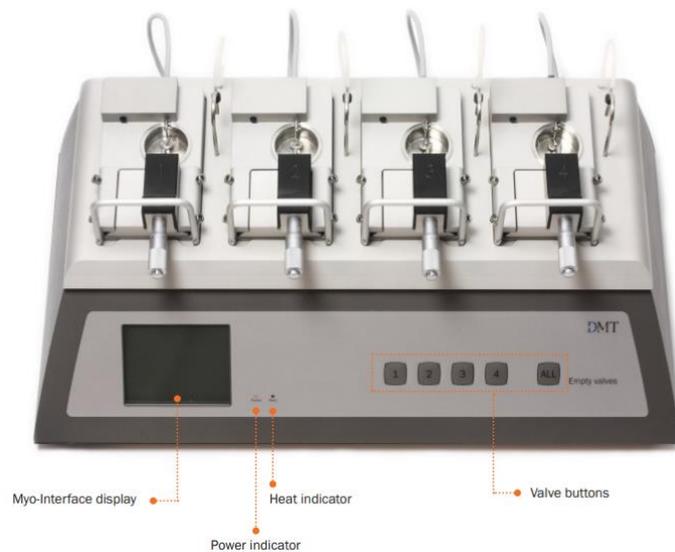


Figura 3. Miógrafo DMT. *Multi wire myograph system 620M.*

3.7.1 Estudio de la función vascular de la aorta

Los anillos de 2 mm de aorta se montaron en los alambres de la cámara del miógrafo (*Danish Myo Technology mod. 620M, CIBERTEC S.A., España*) con solución de Krebs-Henseleit (5 mL/cámara), para simular condiciones fisiológicas, a 37°C y con burbujeo continuo de carbógeno (mezcla de 95 % O_2 / 5 % CO_2).

Los anillos se normalizaron mediante el software LabChart 7 Pro v.7.3.8 (ADInstruments). Este software analiza en tiempo real la tensión del vaso de estudio. El proceso de normalización de los vasos de estudio terminó cuando estos alcanzaron una tensión fisiológica de 13,3 kPa. Para alcanzar este objetivo, el miógrafo cuenta con un micrómetro en cada cámara. Este micrómetro está conectado a un transductor que mide la fuerza que se ejerce sobre el vaso hasta alcanzar la tensión objetivo del proceso de normalización. Una vez normalizados los anillos de aorta, estos, se dejaron estabilizar por un periodo de 90 minutos. Una vez estabilizados los vasos, se indujo un estímulo vasoconstrictor inicial con KCl (60 mM) para comprobar la reactividad del vaso, la vitalidad del tejido y obtener la máxima contracción vascular. El KCl activa canales de calcio dependientes de voltaje en las células de la

musculatura lisa vascular, provocando la despolarización de la membrana, siendo un mecanismo de contracción independiente de receptor (Gimeno Raga, 2019).

3.7.2 Curvas de contracción y relajación

Se utilizaron concentraciones crecientes de agonistas vasoactivos independientes y dependientes del endotelio con función vasoconstrictora (fenilefrina, independiente) y vasodilatadora (metacolina, dependiente; nitroprusiato sódico, independiente), para obtener curvas dosis- respuesta o utilizar solo una concentración fija para estudiar la tensión isométrica que generan los mismos. El rango de concentraciones utilizadas en las curvas de respuesta frente a estos estímulos fue establecido en base a experimentos previos realizados en el laboratorio. Las concentraciones utilizadas fueron las que se detalla a continuación: fenilefrina (Phe, 10^{-9} – 10^{-5} M), metacolina (Mch, 10^{-9} – 10^{-5} M) y nitroprusiato sódico (SNP, 10^{-6} M).

Todos los datos fueron graficados en una curva XY con ajuste farmacológico que permitió obtener las variables $E_{máx}$ (concentración del agonista que produce el efecto máximo) y EC50 (concentración requerida para obtener el 50 % del efecto máximo).

3.7.2.1 Curva de fenilefrina

La fenilefrina (Phe) es un agente simpaticomimético que ejerce su acción preferentemente sobre los receptores adrenérgicos, con una actividad predominantemente alfa-adrenérgica. Este estímulo genera vasoconstricción periférica y un incremento de la presión arterial. En la reactividad vascular se mide la vasoconstricción que se genera en los anillos de aorta (**Figura 4**). Esta se da tras la activación de la fosfolipasa C por la proteína G, generando un aumento de calcio, diacilglicerol e inositol trifosfato. El diacilglicerol estimula a la proteína quinasa C y fosforila a la miosina de las células musculares provocando la contracción del tejido. Para este estudio se determinaron las respuesta a dosis crecientes de Phe (10^{-9} – 10^{-5} M), las que fueron agregándose de forma sistemática al baño con la aorta cada 5 minutos.

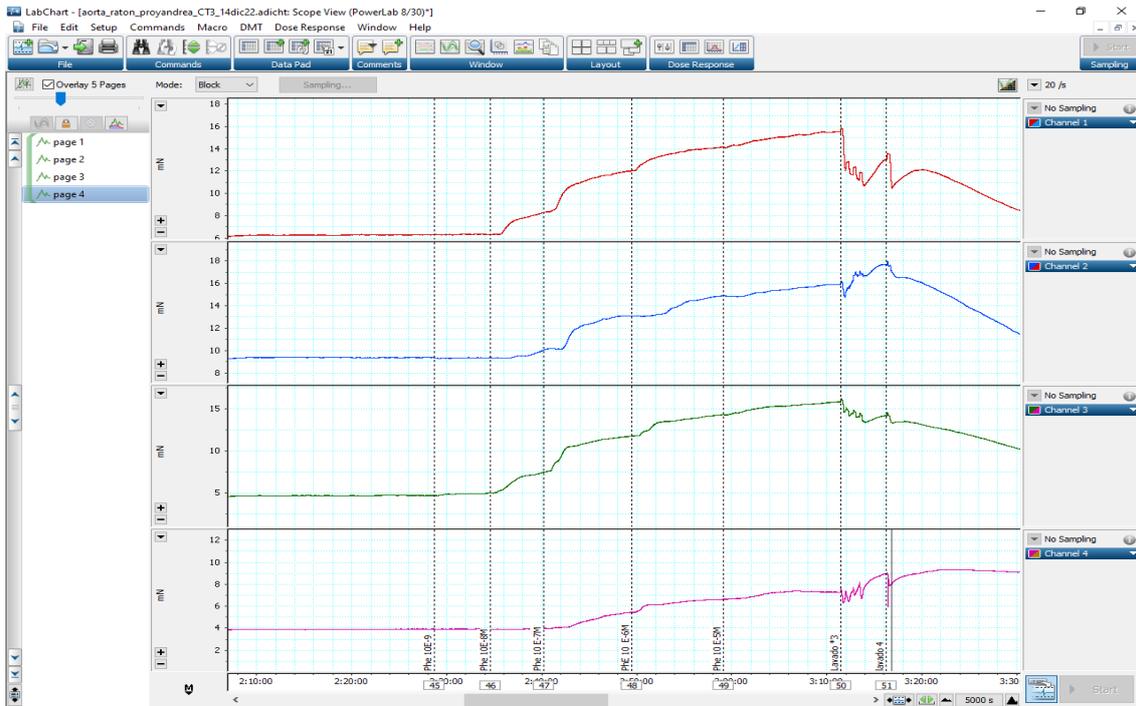


Figura 4. Registro de reactividad vascular visualizado con el software de análisis de datos LabChart™. En esta imagen se observa un ejemplo representativo de la vasoconstricción provocada por la adición de fenilefrina (curva dosis respuesta $10^{-9} - 10^{-5}$ M).

3.7.2.2 Curva de metacolina

La vasodilatación dependiente de endotelio se evaluó mediante una curva de metacolina (Mch; **Figura 5**). Para ello, se añadieron dosis crecientes de Mch sobre los baños con los anillos de aorta previamente contraídos con la concentración submáxima de Phe (10^{-6} M). La dosis submáxima de un fármaco se determina experimentalmente y corresponde con la dosis a la que se genera el 80 % de la contracción máxima en las células musculares lisas.

La Mch es un derivado sintético de la acetilcolina (acetil- β -metilcolina) cuyo mecanismo de acción es actuar sobre los receptores muscarínicos localizados en el endotelio vascular. Los efectos de Mch se relacionan con la liberación de NO (agente vasodilatador) hacia las capas más profundas de músculo liso en el vaso sanguíneo (Perpiñá Tordera et al., 2013).

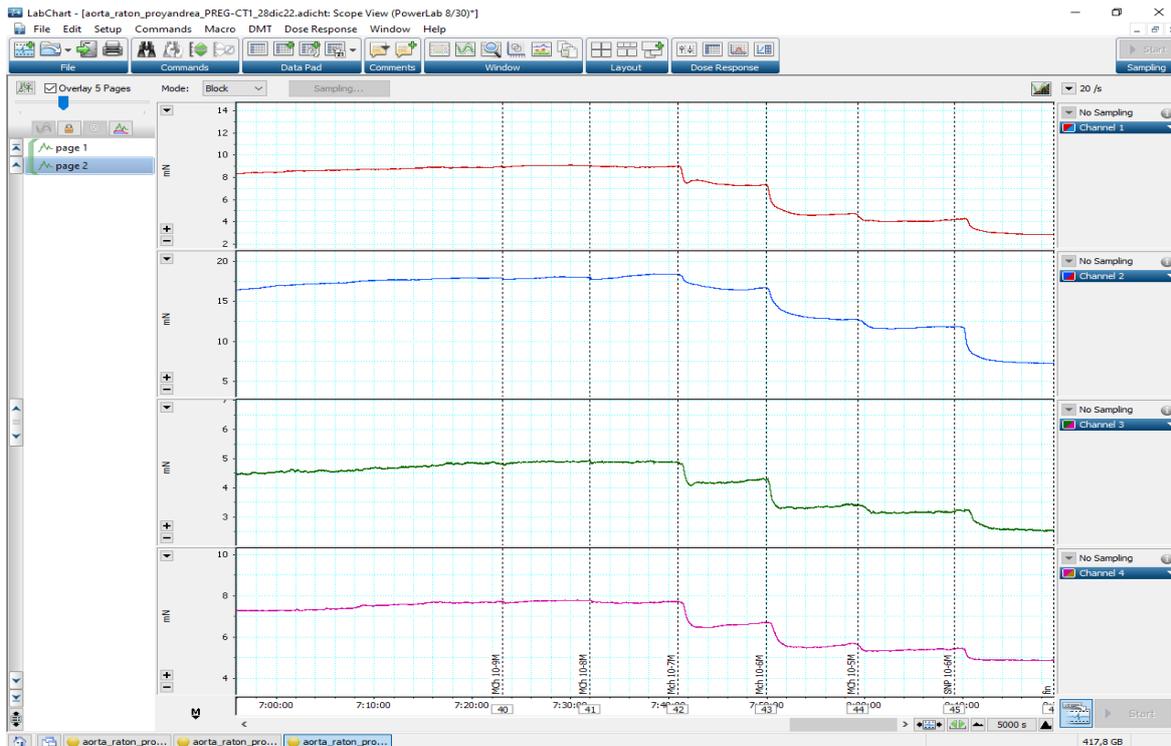


Figura 5. Registro de reactividad vascular visualizado con el software de análisis de datos LabChart™. En esta imagen se observa un ejemplo representativo de la vasodilatación provocada por la adición de metacolina (curva dosis respuesta $10^{-9} - 10^{-5}$ M) y nitroprusiato sódico (concentración única 10^{-6} M), previa precontracción con la dosis submáxima de fenilefrina (10^{-6} M).

3.7.2.3 Vasodilatación en respuesta a nitroprusiato sódico

La vasodilatación independiente de endotelio se evaluó para verificar que la respuesta del músculo liso vascular frente a donantes exógenos de NO estaba intacta. Esto función se evaluó con el nitroprusiato sódico. En cada baño del miógrafo se añadió SNP a una concentración única de 10^{-6} M (**Figura 5**) (Gimeno Raga, 2019).

3.8 Análisis estadísticos

Los análisis estadísticos de los datos se realizaron con el software *GraphPad Prism* versión 9.5.1, utilizando el test ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey, considerándose las diferencias estadísticamente significativas a partir de valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Estudio de la variación de peso de los ratones

En la **Figura 6** se muestra el incremento de peso en las hembras gestantes de los diferentes grupos experimentales. El grupo CT corresponde a la condición control correspondiente al Grupo 1 explicado en el apartado 3.4 de materiales y métodos. El grupo HC corresponde a la condición MSPH correspondiente con la dieta del Grupo 2. El grupo HC-AOVE sigue la dieta del Grupo 3, y la condición AOVE-HC-AOVE sigue la alimentación propuesta para el Grupo 4. Como puede apreciarse, existen diferencias significativas si se compara la condición CT con los grupos HC y HC-AOVE (en los que los animales subieron menos de peso que los controles). Para dilucidar si este menor incremento de peso se asoció con un menor número de crías, se graficó el número de crías para cada una de las gestantes de los diferentes grupos (**Figura 7**). Los resultados indican que el grupo HC y HC-AOVE tienen un número de crías comparable al grupo CT. Sin embargo, los animales del grupo AOVE-HC-AOVE presentaron un menor número de crías comparado con los animales controles.

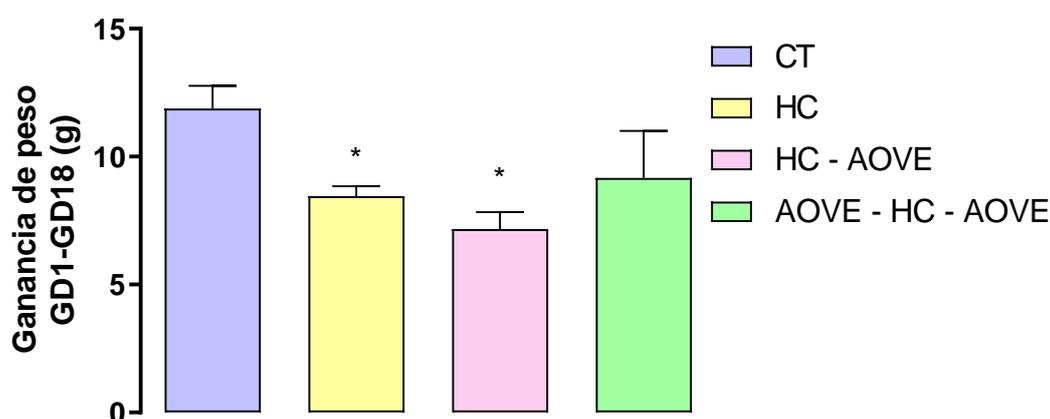


Figura 6. Incremento de peso de los animales durante el periodo gestacional entre los diferentes grupos experimentales. El peso de los animales de los cuatro grupos de estudio fue registrado el día gestacional 1 y 18. CT (violeta): animales con dieta control toda la gestación. HC (amarillos): animales con dieta HC los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control. HC-AOVE (rosa): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de gestación, previamente dieta control. AOVE-HC-AOVE (verde): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control y AOVE (desde tres semanas previas al embarazo hasta el día 13 de gestación). Los resultados representan la media y el error estándar. * $p < 0,05$ vs CT. N= 5 animales por grupo.

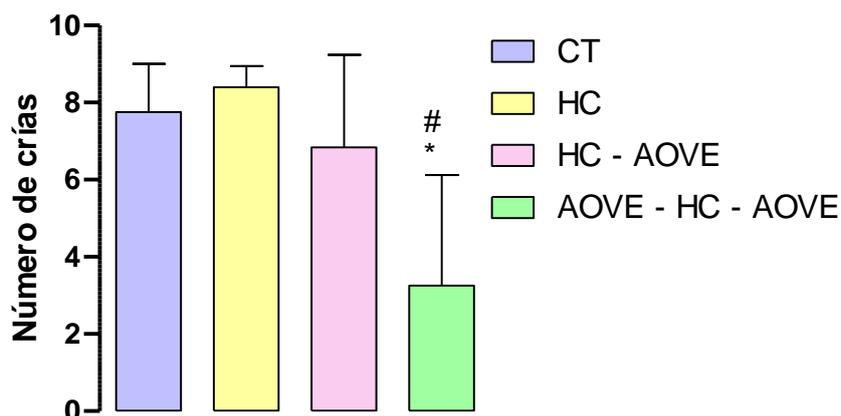


Figura 7. Número de crías de las hembras embarazadas. El número de crías correspondiente a cada grupo se registró en el eje de ordenadas. CT (violeta): animales con dieta control toda la gestación. HC (amarillos): animales con dieta HC los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control. HC-AOVE (rosa): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de gestación, previamente dieta control. AOVE-HC-AOVE (verde): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control y AOVE (desde tres semanas previas al embarazo hasta el día 13 de gestación). Los resultados representan la media +/- error estándar. * $p < 0,05$ vs CT. # $p < 0,05$ vs HC. N= 5 animales por grupo.

4.2 Efectos del AOVE sobre el perfil lipídico en un modelo animal de hipercolesterolemia

En las gráficas presentadas a continuación se muestran las determinaciones séricas de colesterol y triglicéridos totales en el suero materno. En el eje de abscisas se representan los cuatro grupos experimentales de estudios descritas en el punto 4.1. En el eje de ordenadas se representa las concentraciones plasmáticas de dichas determinaciones en mg/dL.

4.2.1 Evaluación de colesterol total

En la **Figura 8** se muestra las determinaciones séricas del colesterol total en las muestras de los diferentes grupos experimentales. Los valores de colesterol muestran diferencias significativas entre los grupos experimentales CT y HC.

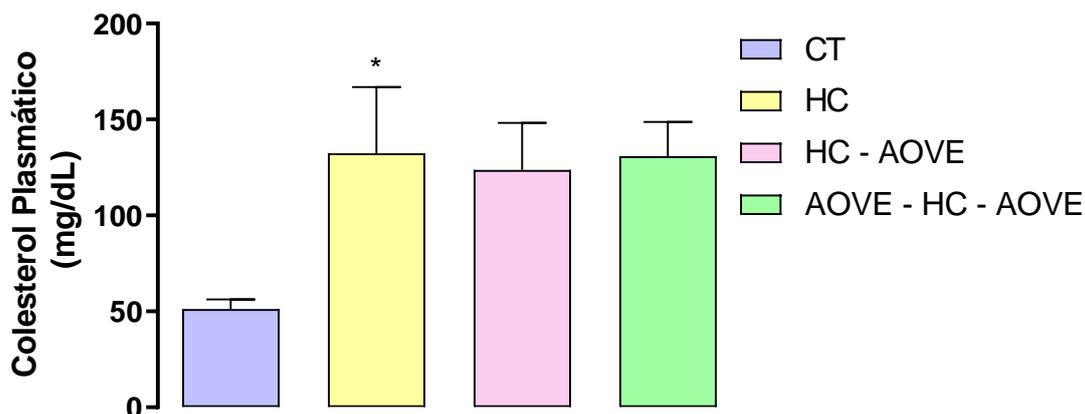


Figura 8. Determinaciones séricas del colesterol total en muestras séricas. Se representa las mediciones de colesterol en muestras de suero maternas. CT (violeta): animales con dieta control toda la gestación. HC (amarillos): animales con dieta HC los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control. HC-AOVE (rosa): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de gestación, previamente dieta control. AOVE-HC-AOVE (verde): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control y AOVE (desde tres semanas previas al embarazo hasta el día 13 de gestación). Los resultados representan la media +/- error estándar. * $p < 0,05$ vs CT. N= 5 animales por grupo.

4.2.2 Evaluación de triglicéridos totales

En la **Figura 9** se muestra las determinaciones séricas de los triglicéridos totales en las muestras de los diferentes grupos experimentales. No se apreciaron diferencias significativas entre los diferentes grupos experimentales.

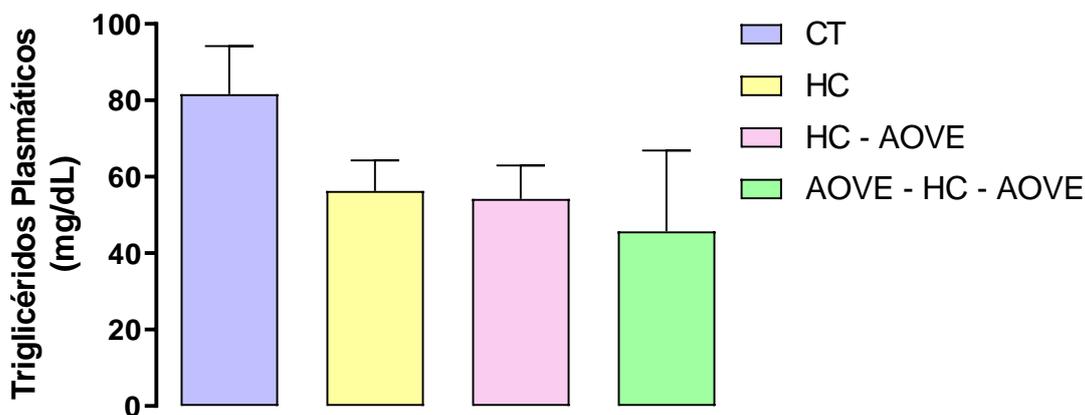


Figura 9. Determinaciones séricas de los triglicéridos totales en muestras séricas.

Las diferencias se presentan en el gráfico. CT (violeta): animales con dieta control toda la gestación. HC (amarillos): animales con dieta HC los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control. HC-AOVE (rosa): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de gestación, previamente dieta control. AOVE-HC-AOVE (verde): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control y AOVE (desde tres semanas previas al embarazo hasta el día 13 de gestación). Los resultados representan la media +/- error estándar. N= 5 animales por grupo.

4.3 Ensayos de reactividad vascular

En esta sección se muestran las gráficas correspondientes a las curvas dosis - respuesta frente a los estímulos descritos en el apartado 3.7.2 de la sección Material y Métodos. La concentración de cada estímulo se expresa en escala logarítmica (log M) en el eje de abscisas. En cuanto a los gráficos de barras en el eje de abscisas se muestran las condiciones experimentales y en eje de ordenadas se expresan los valores de IC100, contracción con KCl (M) o porcentaje de relación producido por el SNP, según corresponda.

4.3.1 Valores de circunferencia interna en aorta

En la **Figura 10** se presentan los datos de la circunferencia interna de las aortas maternas estiradas para alcanzar una tensión dada, la que corresponde a la requerida para obtener una presión transmural de 100 mmHg (IC100). En las gráficas se representa el IC100 de las aortas maternas en el eje de ordenadas en μm . En los ensayos de miografía todas las determinaciones experimentales se realizaron en los vasos sanguíneos tensionados a su IC100, lo que recibe el nombre de normalización y tiene como objetivo la estandarización de los escenarios experimentales y simular condiciones fisiológicas. La figura muestra una uniformidad en los datos de IC100 comparando los cuatro grupos experimentales (Slezák et al., 2010).

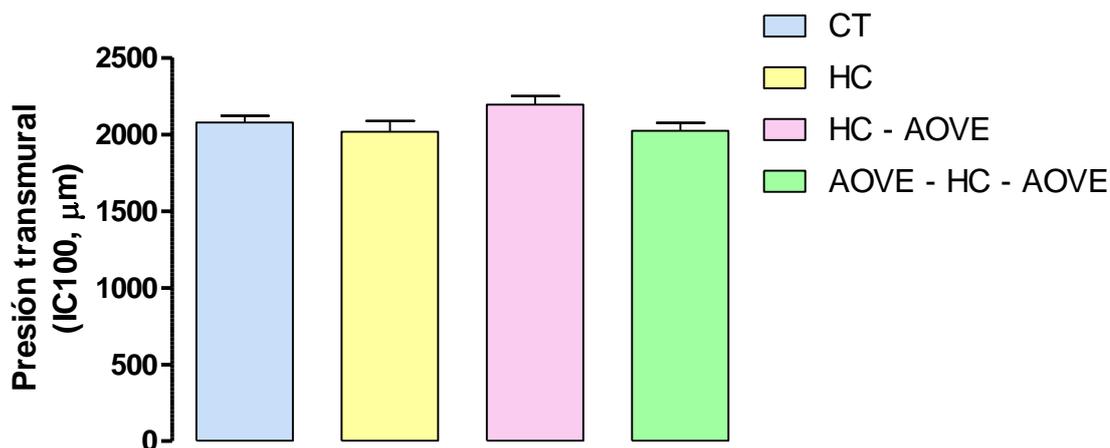


Figura 10. Determinaciones de IC100 en anillos de aorta de ratones. Las diferencias se presentan en el gráfico. CT (violeta): animales con dieta control toda la gestación. HC (amarillos): animales con dieta HC los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control. HC-AOVE (rosa): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de gestación, previamente dieta control. AOVE-HC-AOVE (verde): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control y AOVE (desde tres semanas previas al embarazo hasta el día 13 de gestación). Los resultados representan la media +/- error estándar. N= 5 animales por grupo.

4.3.2 Contracción vascular frente a KCl

En la **Figura 11** se representa la contracción de los anillos de aorta maternos frente a una dosis única del estímulo KCl (60 mM), esto se realiza para determinar la máxima capacidad contractil de los vasos.

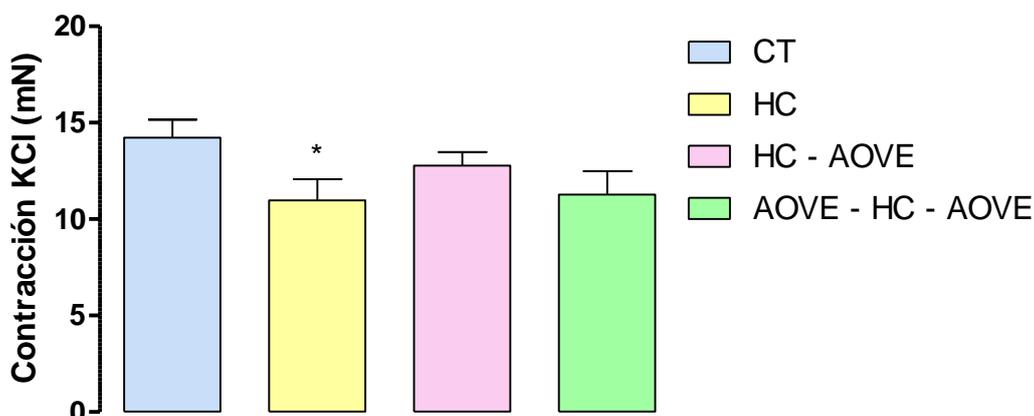


Figura 11. Determinación de la contracción de los anillos de aorta con KCl (mN).

En el eje de ordenadas se expresa la contracción de KCl expresada en mN. CT (violeta): animales con dieta control toda la gestación. HC (amarillos): animales con dieta HC los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control. HC-AOVE (rosa): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de gestación, previamente dieta control. AOVE-HC-AOVE (verde): animales con dieta HC y AOVE los cinco últimos días de la gestación, previamente dieta control y AOVE (desde tres semanas previas al embarazo hasta el día 13 de gestación). Los resultados representan la media +/- error estándar. N= 5 animales por grupo. *p < 0,05 vs CT.

4.3.3 Curva dosis-respuesta frente a fenilefrina

La **Figura 12** muestra la respuesta vasoconstrictora de las aortas maternas a dosis crecientes de fenilefrina (Phe, 1×10^{-9} M - 1×10^{-5} M). En el análisis de la respuesta constrictora, se aprecia que la contracción máxima inducida por este agonista alfa-adrenérgico es superior en los grupos experimentales CT y HC que en los grupos en los que hay un tratamiento con AOVE, lo que se confirma al analizar la información descriptiva de las curvas en las que la contracción máxima ($E_{m\acute{a}x}$) es mayor en los grupos experimentales CT y HC (27,7 % y 29,6 %, respectivamente) que en los grupos en los que hay un tratamiento con AOVE (20,8 % y 18,7 %, respectivamente).

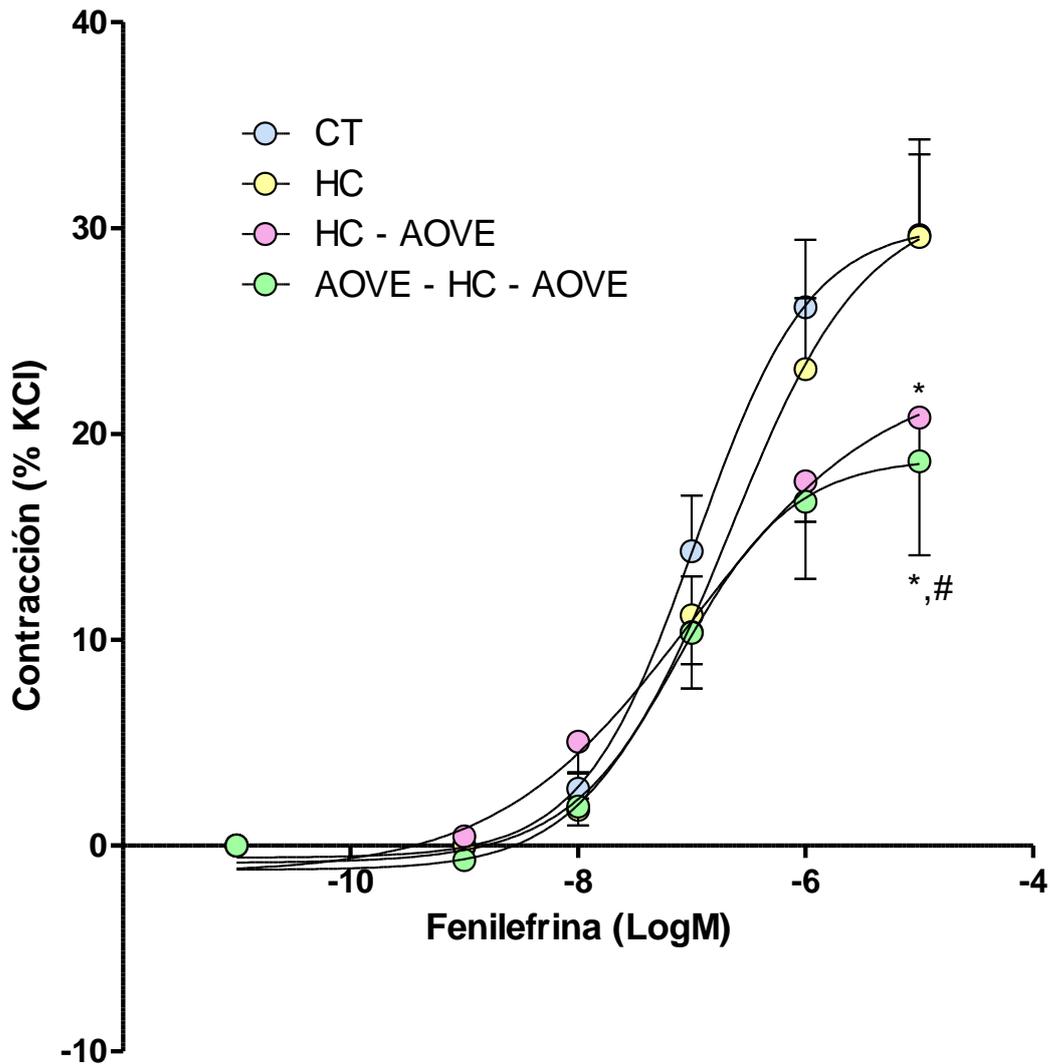


Figura 12. Curva dosis - respuesta de vasoconstricción de los anillos de aorta frente a fenilefrina (10^{-9} - 10^{-5} M). Los resultados corresponden a la media \pm el error estándar y están expresados como porcentajes relativos respecto a la concentración máxima inducida por KCl (60 mM). * $p < 0,05$ vs CT. # $p < 0,05$ vs HC.

4.3.4 Curva dosis-respuesta frente a metacolina

La relajación vascular dependiente del endotelio fue evaluada en las aortas maternas en respuesta a metacolina (Mch). Como se observa en la **Figura 13**, la mayor capacidad de relajación (E_{max}) se obtuvo en los grupos experimentales CT, HC-AOVE y AOVE-HC-AOVE (76,4 %, 61,9 % y 82,3 %, respectivamente), frente al 52,3 % registrado en el grupo HC, aunque las diferencias estadísticamente significativas se determinaron solo entre CT y HC, así como también entre HC y AOVE-HC-AOVE.

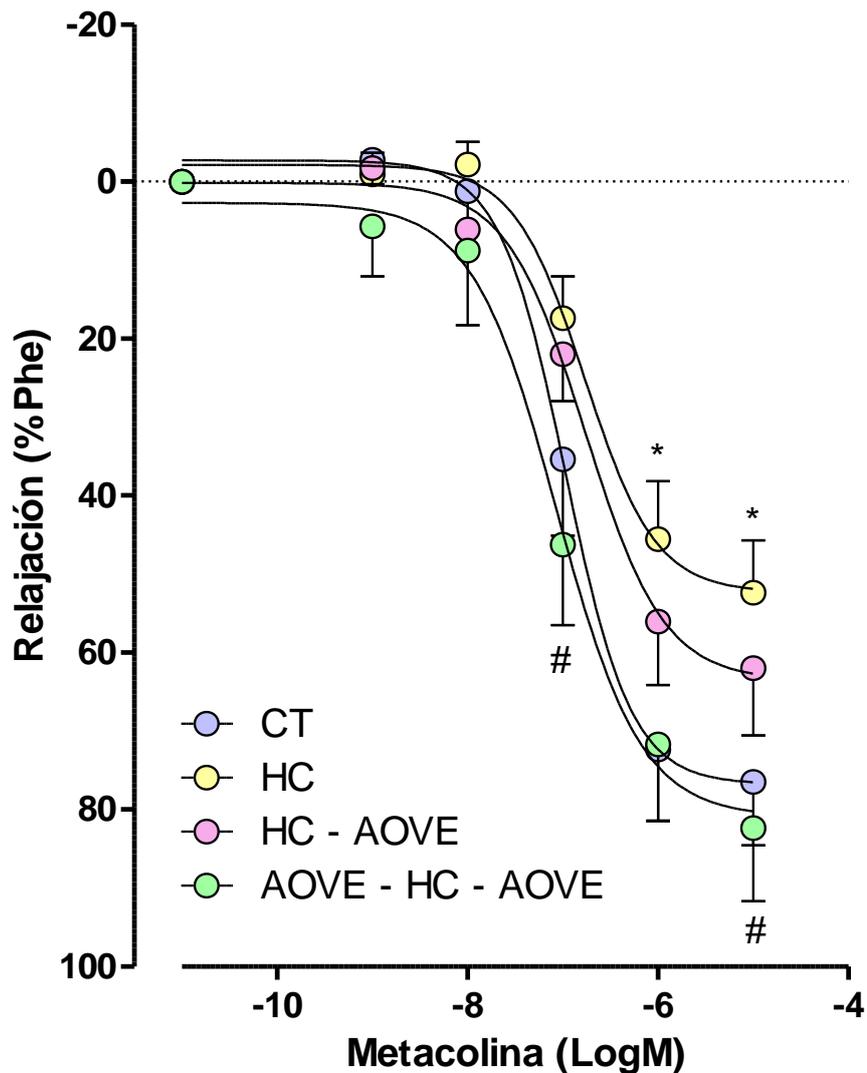


Figura 13. Curva dosis - respuesta de vasodilatación frente a metacolina (10^{-9} - 10^{-5} M). Los resultados corresponden a la media +/- el error estándar y están expresados como porcentajes de relajación respecto a la concentración submáxima de Fenilefrina (10^{-6} M). Significancia estadística * $p < 0,05$ vs CT; # $p < 0,05$ vs HC.

4.3.5 Curva dosis-respuesta frente a SNP

El nitroprusiato sódico (SNP), donador de NO, induce una vasodilatación independiente de endotelio, al actuar directamente sobre las células de la musculatura lisa vascular, como se ha comentado. Como puede observarse en la **Figura 14**, la relajación independiente de endotelio fue similar en los diferentes grupos experimentales.

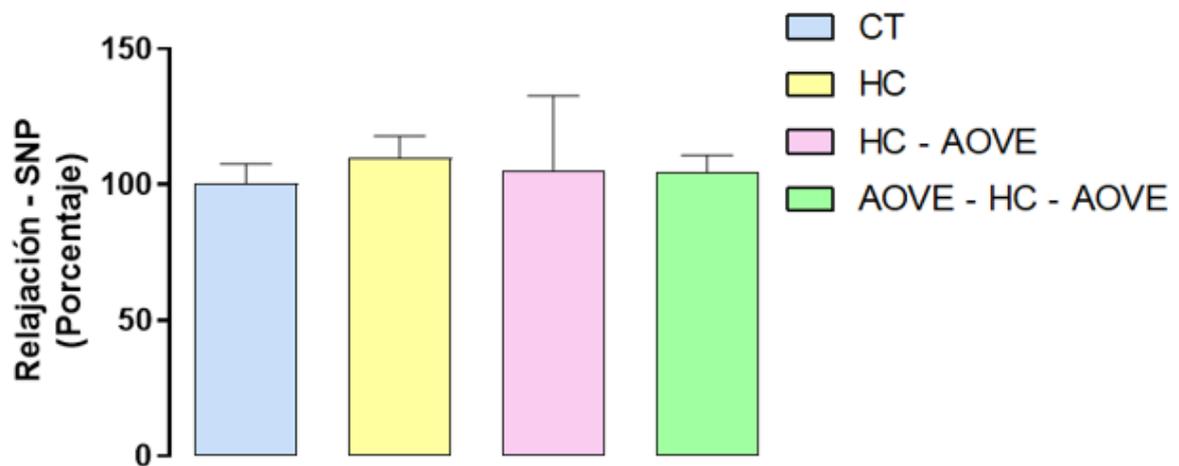


Figura 14. Determinación de vasodilatación mediada por una concentración única de nitroprusiato sódico (10^{-6} M). Los resultados están expresados como la media +/- el error estándar y están expresados como porcentajes de relajación en cada uno de los grupos experimentales.

5. DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS FUTURAS

La condición MSPH es una enfermedad materna que se da en periodo gestacional y que compromete la salud vascular de la madre y la de la vida adulta del recién nacido. De esta patología gestacional no se realiza un seguimiento clínico debido a: (1) poca investigación en el área que demuestre si los efectos descritos a nivel experimental son extrapolables a grandes poblaciones, y (2) la inexistencia de tratamientos farmacológicos no teratogénicos, que dificulta el avance en la investigación clínica a este respecto. Debido a ello, en este estudio se ha evaluado como posible tratamiento para MSPH una intervención nutricional con un agente con importantes y reconocidas acciones antioxidantes como es el AOVE, el cual se ha demostrado que es apto para el consumo en periodo gestacional y que además posee importantes efectos antiteratogénicos (Marcelino et al., 2019).

En este trabajo fin de máster se ha establecido un modelo preclínico de la condición MSPH utilizando un modelo murino y una dieta alta en colesterol en el periodo final de la gestación, modelo que ha sido publicado por otro grupo de investigación, quienes han demostrado que estos animales desarrollan las características que describe la patología. De esta forma, hemos demostrado que nuestro modelo experimental presenta un aumento de los niveles plasmáticos de colesterol en suero materno después de 5 días de consumo de la dieta alta en colesterol. Además, se ha analizado la ganancia de peso de los ratones entre el día gestacional 1 y el día gestacional 18, concluyendo que los ratones de las condiciones HC y HC-AOVE tienen un incremento de peso menor comparado con CT. Este comportamiento se puede dar por el tipo de dieta hipercolesterolémica o debido a que la ingesta de pienso fuese menor con el cambio de dieta. Dado que en nuestro caso no hemos observado diferencias en la ingesta sólida entre los grupos, podemos sugerir que la ganancia de peso se ve afectada por el tipo de pienso y no por la cantidad de pienso que se ingiere. Además, para determinar que la ganancia de peso no se viera afectada por el número de crías, nuestros datos muestran un número comparable de crías en los grupos HC y HC-AOVE respecto al CT, lo que descarta a este factor como modulador de la ganancia de peso. Curiosamente, el número de crías fue menor en el grupo AOVE-HC-AOVE con respecto al CT. En este sentido, especulamos que una de las causas que podría asociarse a este cambio es la edad en la que se embarazaron las hembras después del cruce. La fecha de nacimiento de todas las hembras utilizadas en este TFM fue el 25 de septiembre de 2022. En grupos CT, HC y HC-AOVE, las hembras se encontraban embarazadas a los dos-tres meses de edad. Debido al diseño experimental, el que requería una suplementación de tres semanas con AOVE previo al embarazo, las hembras de la condición

AOVE–HC–AOVE se pusieron en cruce a una edad mayor, lo que dificultó el apareo con los machos, y esto se manifestó en un embarazo efectivo casi a los 4 meses de edad, pudiendo influir, por tanto, esta edad madura de las hembras en los eventos reproductivos.

Los estudios de las determinaciones séricas de colesterol mostraron un aumento significativo del colesterol en la condición HC con respecto a CT, siendo el resultado esperado debido a que la dieta seguida por la condición HC presenta un 2 % de colesterol y 0,5 % de ácido cólico. En la condición HC-AOVE, también se induce un aumento de la concentración sérica de colesterol, aunque el cambio no tiene significancia estadística. Por otro lado, las determinaciones séricas de triglicéridos no muestran cambios significativos entre las condiciones experimentales propuestas en este estudio.

En los estudios de reactividad vascular se analizaron diferentes parámetros, incluyendo la presión transmural de los anillos aórticos (IC100, μm), la contracción mediada por KCl (mN), el porcentaje de relación producido por el SNP, los eventos de contracción mediados por fenilefrina, y la relajación mediada por metacolina.

La presión transmural o IC100 de los anillos de aorta de los animales presentaron poca variación en cuanto a este parámetro y, por tanto, no presentaron cambios significativos entre los cuatro grupos experimentales, lo que determina que el comportamiento de los vasos en cualquier condición experimental es uniforme.

El gráfico de contracción mediado por KCl muestra cambios significativos si comparamos la condición HC con la CT, siendo este valor de contracción menor en los anillos aórticos de los ratones tratados con dieta hipercolesterolémica. Este dato puede dar evidencia de que exista una disfunción vascular de base en los anillos aórticos de los animales HC, lo que se corrige al tratar a los animales con AOVE solo durante la gestación o antes y durante este periodo. Por otra parte, el nivel de contracción del vaso frente a fenilefrina no arroja diferencias significativas entre las condiciones HC y CT. Por tanto, se puede concluir que la dieta hipercolesterolémica suministrada en este estudio no interfiere en su capacidad de contracción en respuesta a fenilefrina, la que depende de receptores alfa adrenérgicos y canales de calcio (Kim et al., 2014).

Un resultado importante de este TFM se observa en el gráfico de contracción en respuesta a fenilefrina, donde se observa que los animales tratados con AOVE muestran una menor contracción ante este agonista adrenérgico. Estos resultados podrían indicar que el

AOVE actúa, mediante un mecanismo no descrito hasta el momento, sobre los receptores adrenérgicos o los canales de calcio de los anillos aórticos maternos, generando un menor efecto de la fenilefrina. En términos vasculares, este resultado podría interpretarse como positivo, ya que se asocia con menor contracción, lo que eventualmente podría ser beneficioso en un modelo de hipertensión arterial del embarazo. Si bien se ha descrito previamente que el AOVE no modifica la respuesta a fenilefrina en animales no embarazados (Reyes-Goya et al., 2022), los resultados de este TFM muestran por primera vez un efecto diferencial cuando la aorta proviene de una hembra con embarazo a término, lo que se presenta como una nueva área de estudio especialmente interesante si se plantea como modelo una patología gestacional asociada con un aumento en la presión arterial, como es la preeclampsia.

En la gráfica de relajación frente a metacolina se puede observar cambios significativos si comparamos la condición HC con respecto al CT, lo que permite concluir que una alimentación hipercolesterolémica disminuye la capacidad de relajación de los vasos sanguíneos frente a un donador de NO dependiente de endotelio como es la metacolina. Este resultado confirma que el modelo con el que trabajamos replica lo que ya se ha publicado por otro grupo de investigación (Sáez et al., 2019). En la misma figura se puede observar el resultado que confirma la hipótesis de este TFM, ya que se observa una diferencia significativa en términos de relajación vascular dependiente del endotelio entre la condición HC y AOVE-HC-AOVE. Si bien se observa una diferencia entre HC y HC-AOVE, no se alcanza la significación estadística. En este sentido, sería interesante incrementar el tamaño muestral para poder alcanzar conclusiones más robustas a este respecto.

En cuanto al comportamiento de los vasos frente a la vasodilatación producida por el donador de NO independiente de endotelio (SNP), no hay cambios significativos entre los cuatro grupos experimentales, lo que indica que los vasos reaccionan adecuadamente al óxido nítrico y que la musculatura se encuentra en condiciones óptimas. Por tanto, los defectos vasculares en el modelo HC parecen responder a problemas de función endotelial, una alteración que se corrige al agregar AOVE a la dieta.

En otros estudios, se han determinado otras vías de intervención en madres hipercolesterolémicas con el objetivo último de reducir la aterogénesis. Una vía descrita en un modelo experimental es el uso de otro agente antioxidante como la vitamina E en madres hipercolesterolémicas, que tiene efectos beneficiosos a largo plazo en la descendencia. En este estudio han disminuido notablemente la formación de estrías grasas durante el desarrollo fetal

en hembras hipercolesterolémicas tratadas con vitamina E o colestiramina. También se observó una reducción del contenido de la íntima en productos de peroxidación lipídica en el momento del nacimiento (Palinski et al., 2001). Este estudio indica que los efectos de nuestro agente antioxidante, el AOVE, son independientes de su efecto sobre el colesterol. Otra de las opciones que se ha planteado es la inducción de anticuerpos específicos contra la oxidación en la madre antes del embarazo, ya que las citocinas e interleucinas inflamatorias promueven la aterogénesis. La inmunización materna con antígenos prevalentes en las lesiones ateroscleróticas reduce notablemente la aterogénesis en la descendencia adulta mediante mecanismos que incluyen la protección del feto contra la programación aterosclerótica por la hipercolesterolemia materna. También indican que la inmunización materna con OxLDL provoca cambios persistentes en las respuestas específicas postnatales de células B y anticuerpos, que son independientes del paso transplacentario de inmunoglobulinas. Esto establece, en principio, que es posible influir en la programación fetal de las respuestas IgM postnatales mediante la inmunización materna con antígenos seleccionados, y puede abrir un nuevo enfoque preventivo no sólo para la aterosclerosis, sino también para otras enfermedades inmunomoduladas (Yamashita et al., 2006).

En este contexto y en términos de posibles perspectivas futuras de este trabajo, una de ellas, sería determinar el estatus oxidativo en los animales, evaluando niveles de LDL oxidadas, peroxidación lipídica, capacidad antioxidante total, expresión y actividad de la enzima NADPH oxidasa en órganos como el hígado de las diferentes condiciones experimentales. La mayor proyección de este estudio preliminar de investigación básica supondría una eventual extrapolación del modelo murino a un ensayo poblacional en mujeres embarazadas, para comprobar si el AOVE tiene efectos beneficiosos en un contexto MSPH en humanos. Por otro lado, sería interesante estudiar y analizar el mecanismo de acción por el cual el AOVE cambia el perfil de contracción de los vasos sanguíneos frente a un estímulo contráctil como es la fenilefrina.

6. CONCLUSIONES

- Se ha conseguido establecer en nuestro laboratorio un modelo experimental de hipercolesterolemia materna en un modelo animal murino, confirmado por mediciones séricas de colesterol.
- La edad de los animales afecta al proceso gestacional disminuyendo el número de crías. Es decir, se concluye que cuanto más edad tuviesen en el momento del cruce, menor número de crías tendrán cuando el embarazo llegue a término.
- La dieta hipercolesterolémica cambia el perfil de colesterol total en el suero de los animales embarazados. En cambio, no cambia el nivel de triglicéridos, que se mantienen uniforme entre los grupos experimentales.
- Se ha demostrado una menor contracción de los anillos aórticos frente a fenilefrina en los grupos tratados con AOVE, abriendo una posible vía de estudio para enfermedades como la preeclamsia.
- La dieta hipercolesterolémica en embarazadas disminuye la capacidad de relajación vascular dependiente de endotelio, alteración que se revierte mediante suplementación dietética continuada (incluyendo el periodo preconcepción) con AOVE.

7. BIBLIOGRAFÍA

Biagi C, Di Nunzio M, Bordoni A, Gori D, Lanari M. Effect of Adherence to Mediterranean Diet during Pregnancy on Children's Health: A Systematic Review. *Nutrients* 2019;11:997. <https://doi.org/10.3390/nu11050997>.

Cantin C, Garchitorena MJ, Escalona R, Carvajal JA, Illanes SE, Gutierrez J, et al. Increased Circulating Levels of PCSK9 and Pro-Atherogenic Lipoprotein Profile in Pregnant Women with Maternal Supraphysiological Hypercholesterolemia. *Antioxidants* 2022;11:869. <https://doi.org/10.3390/antiox11050869>.

Crovetto F, Crispi F, Casas R, Martín-Asuero A, Borràs R, Vieta E, et al. Effects of Mediterranean Diet or Mindfulness-Based Stress Reduction on Prevention of Small-for-Gestational Age Birth Weights in Newborns Born to At-Risk Pregnant Individuals. *JAMA* 2021;326:2150. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.20178>.

Cuevas M. A, Alonso K R. DISLIPIDEMIA DIABÉTICA. *Rev Médica Clínica Las Condes* 2016;27:152–9. <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2016.04.004>.

Cyr AR, Huckaby L V., Shiva SS, Zuckerbraun BS. Nitric Oxide and Endothelial Dysfunction. *Crit Care Clin* 2020;36:307–21. <https://doi.org/10.1016/j.ccc.2019.12.009>.

Fuenzalida B, Cantin C, Kallol S, Carvajal L, Pastén V, Contreras-Duarte S, et al. Cholesterol uptake and efflux are impaired in human trophoblast cells from pregnancies with maternal supraphysiological hypercholesterolemia. *Sci Rep* 2020;10:5264. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61629-4>.

Fuenzalida B, Sobrevia B, Cantin C, Carvajal L, Salsoso R, Gutiérrez J, et al. Maternal supraphysiological hypercholesterolemia associates with endothelial dysfunction of the placental microvasculature. *Sci Rep* 2018;8:7690. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25985-6>.

Gesteiro E, Bastida S, Rodríguez Bernal B, Sánchez-Muniz FJ. Adherence to Mediterranean diet during pregnancy and serum lipid, lipoprotein and homocysteine concentrations at birth. *Eur J Nutr* 2015;54:1191–9. <https://doi.org/10.1007/s00394-014-0798-5>.

Gimeno Raga M. Alteraciones vasculares inducidas por un modelo de síndrome metabólico en conejo 2019; PhD Thesis. <https://roderic.uv.es/handle/10550/70019> (Acceded June 2023)

Jimenez-Torres J, Alcalá-Díaz JF, Torres-Peña JD, Gutierrez-Mariscal FM, Leon-Acuña A, Gómez-Luna P, et al. Mediterranean Diet Reduces Atherosclerosis Progression in Coronary Heart Disease: An Analysis of the CORDIOPREV Randomized Controlled Trial. *Stroke* 2021;52:3440–9. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.033214>.

Kim J, Choi B-K, Choi J, Ryu T, Roh WS, Song S. Role of calcium channels responsible for phenylephrine-induced contraction in rat aorta 3 days after acute myocardial infarction. *Korean J Anesthesiol* 2014;66:143. <https://doi.org/10.4097/kjae.2014.66.2.143>.

Leiva A, Fuenzalida B, Salsoso R, Barros E, Toledo F, Gutiérrez J, et al. Tetrahydrobiopterin Role in human umbilical vein endothelial dysfunction in maternal supraphysiological hypercholesterolemia. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 2016;1862:536–44. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.01.021>.

Leiva A, de Medina CD, Salsoso R, Sáez T, San Martín S, Abarzúa F, et al. Maternal Hypercholesterolemia in Pregnancy Associates With Umbilical Vein Endothelial Dysfunction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2013;33:2444–53. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.113.301987>.

Leiva A, Salsoso R, Sáez T, Sanhueza C, Pardo F, Sobrevia L. Cross-sectional and longitudinal lipid determination studies in pregnant women reveal an association between increased maternal LDL cholesterol concentrations and reduced human umbilical vein relaxation. *Placenta* 2015;36:895–902. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2015.05.012>.

Lorite Mingot D, Gesteiro E, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. Epigenetic effects of the pregnancy Mediterranean diet adherence on the offspring metabolic syndrome markers. *J Physiol Biochem* 2017;73:495–510. <https://doi.org/10.1007/s13105-017-0592-y>.

Marcelino G, Hiane PA, Freitas K de C, Santana LF, Pott A, Donadon JR, et al. Effects of Olive Oil and Its Minor Components on Cardiovascular Diseases, Inflammation, and Gut Microbiota. *Nutrients* 2019;11:1826. <https://doi.org/10.3390/nu11081826>.

Mauri M, Calmarza P, Ibarretxe D. Dislipemias y embarazo, una puesta al día. *Clínica e Investig En Arterioscler* 2021;33:41–52. <https://doi.org/10.1016/j.arteri.2020.10.002>.

Moreno Villares JM. Los mil primeros días de vida y la prevención de la enfermedad en el adulto. *Nutr Hosp* 2016;33:337. <https://doi.org/10.20960/nh.337>.

Palinski W. Maternal–Fetal Cholesterol Transport in the Placenta. *Circ Res* 2009;104:569–71. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.109.194191>.

Palinski W, D'Armiento FP, Witztum JL, de Nigris F, Casanada F, Condorelli M, et al. Maternal Hypercholesterolemia and Treatment During Pregnancy Influence the Long-Term Progression of Atherosclerosis in Offspring of Rabbits. *Circ Res* 2001;89:991–6. <https://doi.org/10.1161/hh2301.099646>.

Palinski W, NAPOLI C. The fetal origins of atherosclerosis: maternal hypercholesterolemia, and cholesterol-lowering or antioxidant treatment during pregnancy influence in utero. *FASEB J* 2002. <https://doi.org/0892-6638/02/0016-1348>.

Perpiñá Tordera M, García Río F, Álvarez Gutierrez FJ, Cisneros Serrano C, Compte Torrero L, Entrenas Costa LM, et al. Normativa sobre el estudio de la hiperrespuesta bronquial inespecífica en el asma. *Arch Bronconeumol* 2013;49:432–46. <https://doi.org/10.1016/j.arbres.2013.05.001>.

Reyes-Goya C, Santana-Garrido Á, Aguilar-Espejo G, Pérez-Camino MC, Mate A, Vázquez CM. Daily consumption of wild olive (acebuche) oil reduces blood pressure and ameliorates endothelial dysfunction and vascular remodelling in rats with NG-nitro-L-arginine methyl ester-induced hypertension. *Br J Nutr* 2022;128:1206–19. <https://doi.org/10.1017/S0007114522000034>.

Romani A, Ieri F, Urciuoli S, Noce A, Marrone G, Nediani C, et al. Health Effects of Phenolic Compounds Found in Extra-Virgin Olive Oil, By-Products, and Leaf of *Olea europaea* L. *Nutrients* 2019;11:1776. <https://doi.org/10.3390/nu11081776>.

Sáez T, Pageé A, Kirschenman R, Quon A, Spaans F, Davidge ST. A High Cholesterol Diet During Late Pregnancy Impairs Long-Term Maternal Vascular Function in Mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2023;43:120–32. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.122.318421>.

Sáez T, Toledo F, Sobrevia L. Impaired signalling pathways mediated by extracellular vesicles in diabetes. *Mol Aspects Med* 2019;66:13–20. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.12.001>.

Santana-Garrido Á, Reyes-Goya C, Milla-Navarro S, de la Villa P, André H, Vázquez CM, et al. Anti-Inflammatory Action of Dietary Wild Olive (Acebuche) Oil in the Retina of

Hypertensive Mice. *Foods* 2021;10:1993. <https://doi.org/10.3390/foods10091993>.

Slezák P, Waczulíková I, Bališ P, Púzserová A. Accurate normalization factor for wire myography of rat femoral artery. *Physiol Res* 2010;59:1033–6. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932043>.

Thornburg KL, Kolahi K, Pierce M, Valent A, Drake R, Louey S. Biological features of placental programming. *Placenta* 2016;48:S47–53. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2016.10.012>.

Yamashita T, Freigang S, Eberle C, Pattison J, Gupta S, Napoli C, et al. Maternal Immunization Programs Postnatal Immune Responses and Reduces Atherosclerosis in Offspring. *Circ Res* 2006;99. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000244003.08127.cc>.

Yubero-Serrano EM, Fernandez-Gandara C, Garcia-Rios A, Rangel-Zuñiga OA, Gutierrez-Mariscal FM, Torres-Peña JD, et al. Mediterranean diet and endothelial function in patients with coronary heart disease: An analysis of the CORDIOPREV randomized controlled trial. *PLOS Med* 2020;17:e1003282. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1003282>.