

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**DEPARTAMENTO DE OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA**



**TESIS DOCTORAL**

**Evaluación de los niveles de brain derived neutrophilic factor y  
reelina en sangre de cordón umbilical de fetos en relación con  
percentil al nacimiento y afectación doppler**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

**Jara Pascual Manchado**

DIRECTORES

**Juan Antonio León Luis**  
**María del Pilar Pintado Recarte**  
**Luis Ortiz Quintana**

Madrid, 2017

EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE BRAIN DERIVED  
NEUROTROPHIC FACTOR Y REELINA EN SANGRE  
DE CORDÓN UMBILICAL DE FETOS EN RELACIÓN  
CON SU PERCENTIL AL NACIMIENTO Y AFECTACIÓN  
DOPPLER.

TESIS DOCTORAL  
JARA PASCUAL MANCHO

MADRID 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Obstetricia y Ginecología



UNIVERSIDAD  
COMPLUTENSE  
MADRID



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE MEDICINA  
Departamento de Obstetricia y Ginecología



EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE BRAIN DERIVED  
NEUROTROPHIC FACTOR Y REELINA EN SANGRE DE CORDÓN  
UMBILICAL DE FETOS EN RELACIÓN CON SU PERCENTIL AL  
NACIMIENTO Y AFECTACIÓN DOPPLER.

TESIS DOCTORAL  
JARA PASCUAL MANCHO  
Madrid, 2015.



EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE BRAIN DERIVED  
NEUROTROPHIC FACTOR Y REELINA EN SANGRE DE CORDÓN  
UMBILICAL DE FETOS EN RELACIÓN CON SU PERCENTIL AL  
NACIMIENTO Y AFECTACIÓN DOPPLER.

Tesis presentada para optar al grado de  
DOCTOR EN MEDICINA

en la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de  
Madrid

Dña. JARA PASCUAL MANCHO

---

Dirigida por los Dres. :

D. Juan Antonio León Luis

D. María del Pilar Pintado Recarte

D. Luis Ortiz Quintana

---

Madrid 2014



EL DR. D. JUAN ANTONIO LEÓN LUIS, DOCTOR EN  
GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.



CERTIFICA: Que la memoria titulada "Evaluación De Los Niveles De Brain Derived Neurotrophic Factor Y Reelina En Sangre De Cordón Umbilical De Fetos En Relación Con Su Percentil Al Nacimiento Y Afectación Doppler.", presentada por Dña. Jara Pascual Mancho, ha sido realizada bajo mi co-dirección.

Examinado dicho trabajo, doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis doctoral.

Y para que conste y obre a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a Septiembre de 2015

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> El Director



LA DRA. DÑA. MARIA DEL PILAR PINTADO RECARTE, DOCTOR  
EN GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA DE LA FACULTAD DE  
MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID.



CERTIFICA: Que la memoria titulada "Evaluación De Los Niveles De Brain Derived Neurotrophic Factor Y Reelina En Sangre De Cordón Umbilical De Fetos En Relación Con Su Percentil Al Nacimiento Y Afectación Doppler.", presentada por Dña. Jara Pascual Mancho, ha sido realizada bajo mi co-dirección.

Examinado dicho trabajo, doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis doctoral.

Y para que conste y obre a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a Septiembre de 2015

VºBº El Director



EL DR. D. LUIS ORTIZ QUINTANA, PROFESOR DEL  
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA Y OBSTETRICIA DE LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE  
DE MADRID.



CERTIFICA: Que la memoria titulada "Evaluación De Los Niveles De Brain Derived Neurotrophic Factor Y Reelina En Sangre De Cordón Umbilical De Fetos En Relación Con Su Percentil Al Nacimiento Y Afectación Doppler.", presentada por Dña. Jara Pascual Mancho, ha sido realizada bajo mi co-dirección.

Examinado dicho trabajo, doy mi conformidad para su presentación y defensa como Tesis doctoral.  
Y para que conste y obre a los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Madrid a Septiembre de 2015

V<sup>o</sup>B<sup>o</sup> El Director



El trabajo presentado en esta Tesis Doctoral ha sido realizado en el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón y financiado por la Beca Fundación Dexeus Salud de la Mujer.



## **AGRADECIMIENTOS**

---

Agradecer la realización de esta tesis doctoral a los compañeros del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón, adjuntos y residentes. En particular al personal de guardias y paritorio por sacar hasta la última gota de sangre de cordón en guardias saturadas de trabajo y al personal del laboratorio de urgencias por analizar y centrifugar Eppendorf a altas horas de la madrugada.

A Pilar Pintado y Concha Hernandez, mi equipo de guardia.

A la Sección de Ecografías, por medir el último vaso de los RN BPEG.

A mi director de tesis, el Dr. Juan León, sin su insistencia y voluntad no podría haber terminado este estudio, ya que es el mejor "coach" que un doctorando pueda tener.

A la Fundación Dexeus Salud de la Mujer, por su voluntad en potenciar investigaciones noveles.

Al Dr. Carlos Romero y Jorge Morales Camino, médicos responsables del arduo análisis del BDNF y Reelina, que tuvieron que hacer frente a cambio de laboratorio y demás visicitudes.

A toda mi familia, que estuvo preguntándome por la tesis de forma compulsiva hasta el final.



## **ABREVIATURAS (orden alfabético)**

---

ACM: Arteria Cerebral Media  
AGA: Adecuado para la Edad Gestacional (también llamado PAEG)  
AU: Arteria Umbilical  
BDNF: Brain Derived Neurotrophic Factor  
BPEG: Bajo Peso Para La Edad Gestacional  
DT: Desviación Típica  
DWI: Difusión Por Resonancia Magnética (Diffusion Weigthed Imaging)  
CEIC: Comité de Ética e Investigación Clínica  
CIR: Crecimiento Intrauterino Restringido  
CV: Coeficiente de Variación  
DOHAD: Development Origins of Health and Adult Disease  
EG: Edad Gestacional  
FUR: Fecha de la Última Regla  
GEG: Grande Para Edad Gestacional  
HGUGM: Hospital General Universitario Gregorio Marañón  
HIV: Hemorragia Intraventricular  
ICP: Índice Cerebro Placentario  
IP: Índice de Pulsatilidad  
IRS: Inhibidores de la Recaptación de Serotonina  
IZ: Zona Intermedia  
LA: Líquido Amniótico  
LCP: Lower Cortical Plate (Placa Cortical Inferior)  
M: Media  
MZ: Zona Marginal  
NGF: Nerve Growth Factor  
NMDA: N-Metil D-Aspartato  
NP: Neurodesarrollo Postnatal  
P: Percentil  
P: Significación Estadística  
PAEG: Peso Adecuado Para La Edad Gestacional  
PFE: Peso Fetal Estimado  
SG: Semanas Gestacionales Cumplidas  
SNC: Sistema Nervioso Central  
SVZ: Zona Subventricular  
REA: Reanimación Neonatal  
RN: Recién Nacido  
RM: Resonancia Magnética  
RPM: Rotura Prematura De Membranas  
U/C Ratio: Ratio Umbílico/Cerebral  
UCP: Upper Cortical Plate (Placa Cortical Superior)  
VZ: Zona Ventricular



## INDICE GENERAL

---

<b>1. RESUMEN</b> .....	31
<b>2. INTRODUCCION</b> .....	41
<b>2.1.</b> Feto con bajo peso para la edad gestacional (BPEG).....	43
<b>2.2.</b> Feto con bajo peso para la edad gestacional (BPEG) y neurodesarrollo anómalo. ....	62
<b>2.3.</b> BDNF.....	76
<b>2.4.</b> Reelina.....	81
<b>3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.</b> .....	91
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS.</b> .....	95
<b>4.1.</b> Creación de curvas de peso neonatal customizadas propias y aplicación del modelo sobre nuestra población de estudio.....	98
<b>4.2.</b> Comparación de los niveles de Reelina y Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) en sangre de cordón entre recién nacidos con bajo peso para la edad gestacional (BPEG) y recién nacidos con peso adecuado para su edad gestacional (PAEG).....	102
4.2.1. Tipo de estudio y sujetos a estudio.....	102
4.2.2. Variables.....	106
4.2.3. Tipo de variables en relación al estudio.....	108
4.2.4. Métodos de laboratorio.....	108
4.2.5. Recogida de datos y análisis estadístico.....	112
4.2.6. Análisis descriptivo individualizado de Casos y Controles.....	122
4.2.7. Determinación de los valores de referencia de BDNF y Reelina en sangre de cordón de los fetos PAEG.....	122
4.2.8. Estudio comparativo de las variables clínicas materno fetales y perinatales así como las bioquímicas en sangre de cordón umbilical para casos y controles emparejados por edad gestacional y sexo.....	123



4.2.9. Análisis comparativo de casos y controles en la muestra total: Uso de otro tipo de estudio para el análisis comparativo de las variables bioquímicas en sangre de cordón.....	124
4.2.10. Papel del Doppler en los niveles de BDNF y Reelina en fetos BPEG.....	125
<b>5. RESULTADOS.</b> .....	127
5.1 Creación de curvas de peso neonatal customizadas, propias y aplicación del modelo sobre nuestra población de estudio.....	129
5.2 Comparación de los niveles de BDNF y Reelina en sangre de cordón entre recién nacidos BPEG y recién nacidos PAEG.....	135
5.2.1 Análisis descriptivo.....	135
a) Selección de Casos y Controles.....	135
b) Análisis descriptivo individualizado de Casos Controles	137
b.1) Casos: Fetos BPEG.....	137
b.2) Controles: Fetos PAEG.....	142
5.2.2. Determinación de los valores de referencia de BDNF y Reelina en fetos PAEG.....	147
5.2.3. Análisis comparativo de Casos y Controles emparejados.....	158
5.2.4. Determinación de BDNF y Reelina en relación a las variables de estudio en el total de la muestra.....	167
a) Determinación del BDNF en relación a las variables de estudio en el total de la muestra.....	167
b) Determinación de los niveles de Reelina en función de las variables a estudio en el total de la muestra.....	175



5.2.5. Papel del Doppler en los niveles de BDNF y Reelina en fetos BPEG.....	181
<b>6. DISCUSIÓN.</b> .....	191
<b>6.1.</b> Curvas de peso neonatal customizadas propias y aplicación del modelo sobre nuestra población de estudio.....	193
<b>6.2.</b> Comparación de los niveles de Reelina y BDNF en sangre de cordón entre recién nacidos BPEG y PAEG.....	197
6.2.1. Análisis descriptivo individualizado casos y controles.....	197
6.2.2. Valores de referencia del BDNF y Reelina en PAEG.....	206
6.2.3. Análisis comparativo de casos y controles emparejados.....	216
6.2.4. Determinación del BDNF en relación a las variables de estudio en el total de la muestra.....	225
6.2.5. Determinación de Reelina en relación a las variables de estudio en el total de la muestra.....	229
6.2.6. Papel del Doppler en los niveles de BDNF y Reelina.....	235
<b>6.3.</b> Aplicaciones clínicas de los resultados obtenidos en esta memoria.....	242
<b>6.4.</b> Nuevas líneas de investigación.....	243
<b>6.5.</b> Limitaciones.....	244
<b>7. CONCLUSIONES.</b> .....	247
<b>8. ANEXOS.</b> .....	253
<b>9. DIFUSIÓN DEL ESTUDIO.</b> .....	265
<b>10. BIBLIOGRAFIA.</b> .....	269



## INDICE DE FIGURAS

---






<b>Figura 1.</b> Distribución de los distintos tipos de anomalías de crecimiento intrauterino en la población general.....	47
<b>Figura 2.</b> Esquema del mecanismo celular de la alteración del crecimiento intrauterino por insuficiencia placentaria.....	51
<b>Figura 3.</b> Representación esquemática de los mecanismos de adaptación fetal a la insuficiencia placentaria .....	53
<b>Figura 4.</b> Neurodesarrollo prenatal.....	62
<b>Figura 5.</b> Formación del neocórtex hasta el córtex adulto.....	63
<b>Figura 6.</b> Tipos básicos de migración neuronal.....	65
<b>Figura 7.</b> Estructura 3D BDNF (Protein Data Bank by Microswith. Wikicommons).....	76
<b>Figura 8.</b> Función del BDNF mas allá del SNC ( <i>Dan G. Duda et al. J Clin Invest. 2005; 115(3):596-598. Pleiotropy of tissue-specific growth factors: from neurons to vessels via the bone marrow</i> ).....	78
<b>Figura 10.</b> Estructura cristalográfica de la Reelina por Boghog, Wikicommons.....	81
<b>Figura 11.</b> Vía de señalización de la Reelina ( <i>Fatemi et al</i> ).....	86
<b>Figura 12.</b> Fases del estudio.....	97
<b>Figura 13 .</b> Diagrama de flujo de la selección de los pacientes para la creación de curvas de normalidad.....	130
<b>Figura 14.</b> Diagrama de flujo de la selección de los sujetos a estudio y sus características.....	136
<b>Figura 15.</b> Relación entre el BDNF y la edad gestacional en fetos a término y sanos.....	148
<b>Figura 16.</b> Relación del BDNF y sexo del RN en sujetos sanos y a término.....	150

<b>Figura 17.</b> Relación del BDNF con las horas de bolsa rota al nacimiento.....	151
<b>Figura 18.</b> Relación del BDNF y la edad gestacional en fetos a término y sanos, ajustada para el sexo del RN.....	152
<b>Figura 19.</b> Relación de la Reelina con la edad gestacional.....	155
<b>Figuras 20.1-20.5</b> Distribución de las variables hematológicas de sangre venosa en cordón umbilical al nacimiento en relación a la edad gestacional.....	157
<b>Figura 21.</b> Proporción de sujetos emparejados sobre el total de la muestra reclutada.....	159
<b>Figura 22.</b> Gráficos de normalidad de la distribución del BDNF.....	164
<b>Figura 23.</b> Relación de los niveles de BDNF en función del grupo de estudio emparejado (AGA-caso o BPEG-control).....	165
<b>Figuras 24.1-24.2</b> Relación de los niveles de BDNF y la presencia de Hipotiroidismo materno, hemorragia intraventricular del RN.....	171
<b>Figuras 25.1-25.2</b> Relación de los niveles de Reelina y la presencia de Hipotiroidismo materno, hemorragia intraventricular del RN.....	178
<b>Figura 26.</b> Diferencias en los niveles de BDNF en función de los distintos grados de alteración del crecimiento.....	183
<b>Figura 27.</b> Distribución de los sujetos del análisis de la Reelina en función del grado de alteración del crecimiento.....	186
<b>Figura 28.</b> Diferencias en los niveles de Reelina en función de los distintos grados de alteración del crecimiento.....	188
<b>Figura 29.</b> Comportamiento de la Reelina y del BDNF en función del grado de alteración del crecimiento.....	189
<b>Figura 30.</b> Mecanismo molecular de interacción de los estrógenos con el BDNF.....	227

## INDICE DE TABLAS

---

Para facilitar el manejo de las variables introducidas en las tablas se ha dispuesto la indentificación por color de las mismas en base a la naturaleza de cada una:

-  Rosa: Variables maternas
-  Verde: Variables obstétricas
-  Azul: Variables neonatales
-  Naranja: Variables de laboratorio.
-  Marrón: Variables Doppler antenatal.

<b>Tabla 1.</b> Neurodesarrollo y redistribución cerebral.....	72
<b>Tabla 2.</b> Neurodesarrollo en RN con retraso de crecimiento intrauterino ( <i>Arcangeli</i> )..	73
<b>Tabla 3.</b> Resumen de la actividad del BDNF estudiada H: Humanos, R: Ratones. I: Intervención M: Mutación O: Observación.....	79
<b>Tabla 4.</b> Papel de la Reelina en patología.....	89
<b>Tabla 5.</b> Criterios de Inclusión y Exclusión de los sujetos a estudio.....	105
<b>Tabla 6.</b> Características de la población utilizada para crear los percentiles customizados de peso neonatal.....	131
<b>Tabla 7.</b> Coeficientes obtenidos en el modelo.....	133
<b>Tabla 8.</b> Tabla de percentiles de peso FETAL para una mujer de origen español, gestante nulípara de 40 semanas con feto femenino: (peso 3233 gr y SD 11,29%) calculado con las fórmula de Hadlock y <i>Mikolajczyk</i> .....	134
<b>Tabla 9.1-9.4.</b> Características de la población BPEG.....	138
<b>Tabla 10.</b> Características hemodinámicas de la población BPEG.....	141
<b>Tablas 11.1-4</b> Características de la población PAEG.....	142
<b>Tabla 12.</b> Comparativa entre la población de referencia de nuestro hospital y la población a estudio control.....	145
<b>Tabla 13.</b> Distribución del Z-score del BDNF de nuestra población control.....	148

<b>Tabla 14.</b> Regresión lineal de la relación entre el BDNF y la edad gestacional y sexo del RN.....	153
<b>Tabla 15.</b> Regresión lineal de la relación entre el BDNF y la edad gestacional y la rotura de bolsa amniótica de mas de 12 horas.....	154
<b>Tabla 16.</b> Análisis comparativo entre casos y controles emparejados. Variables clínicas materna.....	160
<b>Tabla 17.</b> Análisis comparativo entre casos y controles emparejados. Variables clínicas obstétricas.....	161
<b>Tabla 18.</b> Análisis comparativo entre casos y controles emparejados. Variables clínicas neonatales.....	162
<b>Tabla 19.</b> Análisis comparativo entre casos y controles emparejados. Variables bioquímicas de vena umbilical.....	163
<b>Tabla 20.</b> Distribución de la alteración Doppler en los RN BPEG (casos).....	163
<b>Tabla 21.</b> Estadísticos de normalidad de la Distribución del BDNF.....	164
<b>Tabla 22.</b> Estadístico no paramétrico de la relación entre el BDNF y el grupo de estudio.....	166
<b>Tablas 23.1.-23.4.</b> Análisis univariante de los niveles de BDNF en función de las variables clínicas materna sobre el total de la muestra reclutada.....	168
<b>Tabla 24.</b> Modelo máximo resultante por regresión lineal del nivel de BDNF en función de las variables clínicas recogidas del total de la muestra analizada.....	173
<b>Tabla 25.</b> Modelo óptimo resultante mediante regresión lineal del nivel de BDNF en función de las variables clínicas recogidas del total de la muestra.....	174
<b>Tablas 26.1-26.4.</b> Análisis descriptivo del total de muestra analizada de Reelina.....	175
<b>Tabla 27.</b> Modelo máximo de la relación de la Reelina con las variables prenatales mediante regresión lineal....	180
<b>Tabla 28.</b> Intervalo transcurrido entre la última ecografía y el parto.....	182

<b>Tabla 29.</b> Niveles de BDNF en función de los distintos estadios de alteración del crecimiento.....	182
<b>Tabla 30.</b> Influencia de la alteración del crecimiento fetal en los niveles de BDNF ajustados para las variables prenatales que influenciaban en el análisis previo, mediante regresión lineal.....	184
<b>Tabla 31.</b> Relación de los niveles de BDNF en función de la alteración precoz del crecimiento.....	185
<b>Tabla 32.</b> Análisis mediante regresión lineal, de la influencia de la alteración del crecimiento fetal en los niveles de BDNF ajustados para las variables prenatales identificadas en el análisis previo.....	187
<b>Tabla 33.</b> Análisis mediante regresión lineal, de la influencia de la alteración del crecimiento fetal en los niveles de Reelina ajustados para las variables prenatales identificadas en el análisis previo.....	189
<b>Tabla 34.</b> Resumen de los estudios publicados hasta la fecha sobre los niveles de BDNF en sangre de cordón en función de variables antenatales.....	213



## **1. RESUMEN**



## 1. RESUMEN

---

El bajo peso al nacimiento representa una entidad que afecta al 10% de los embarazos. Se ha estudiado el efecto que el bajo peso tiene en la salud postnatal, sobretodo su influencia en el neurodesarrollo. La clasificación correcta de la población permite un diagnóstico más preciso. Por este motivo, la primera fase de esta memoria consiste en la identificación de las variables antenatales maternas influyentes en el peso neonatal así como la elaboración de curvas referenciales poblacionales customizadas con dichas variables, para la mejora del diagnóstico de las alteraciones de crecimiento. Tras recoger de forma retrospectiva los pesos neonatales y las variables antenatales de los partos ocurridos en el HGUGM durante 6 años, se ha identificado la raza materna y la paridad como factores antenatales influyentes, a parte del sexo fetal y la edad gestacional, y se han incluido en las tablas referenciales de nuestra población. El modelo obtenido tiene una  $R^2$  de 0.192.

Por otro lado, para mejorar la comprensión de las fases intermedias que ocasionan una alteración del neurodesarrollo en los RN con bajo peso para la edad gestacional se ha elegido

## Resumen

la evaluación de dos moléculas involucradas en el neurodesarrollo prenatal.

La Reelina es una glicoproteína extracelular de importancia en la migración neuronal. Recientemente se le ha atribuido también funciones de guía axonal y sinaptogénesis por lo que su función no se limita a la migración de las neuronas de la zona ventricular al córtex. Se ha estudiado en el campo de la psiquiatría como la esquizofrenia, trastorno bipolar y Alzheimer, al estar relacionada con procesos de aprendizaje en la edad adulta pero también se ha estudiado en modelos murinos perinatales de restricción proteica e infección, observando una disminución de la concentración de dicha proteína. Respecto a la modificación de su expresión también en modelos murinos de hipoxia perinatal, se ha observado que su producción esta aumentada sobretodo en el córtex motor y somatosensorial y en el giro dentado. No obstante, los resultados son dispares en función de la zona cerebral analizada. Del mismo modo, se ha analizado los niveles de Reelina en sangre de cordón en RN de madres bajo tratamiento antidepresivo viendo que sus niveles son menores que los RN de madres sin tratamiento. Bajo estas observaciones, sobre la posibilidad de detectar Reelina en sangre de cordón, que dichos niveles son reflejo de la producción cerebral y que la hipoxia puede ser un factor

modificador de su expresión, en esta Memoria se decidió analizar la concentración de esta molécula en RN afectados de retraso de crecimiento y sanos.

La segunda molécula analizada es el BDNF. Una neurotrofina que está implicada en el desarrollo sináptico, diferenciación neuronal, pero también interviene en la proliferación y diferenciación de los oligodendrocitos así como en la mielinización. Se ha visto disminuida en la inflamación y en lesiones hipóxico-isquémicas perinatales, por ese motivo es también objeto de estudio en esta Memoria.

Para la evaluación de estas dos moléculas, se han recogido una población de 93 RN AGA y 47 RN BPEG de forma prospectiva.

En los 93 sujetos sanos, se han establecido los valores de BDNF referenciales para la edad gestacional. Conforme avanza la gestación, disminuye la concentración de BDNF en sangre de cordón, las horas de bolsa rota aumentan dichos niveles de forma significativa y los RN de sexo femenino tienen mayores niveles al nacer aunque de forma no significativa.

Dentro de la muestra reclutada se hizo un estudio de 36 parejas caso-control emparejadas por edad gestacional y sexo, para evaluar las diferencias de BDNF entre ellas. Se obtuvo menores niveles de BDNF en RN BPEG aunque de forma no

## Resumen

significativa. Al observar una tendencia decreciente en fetos con alteración del crecimiento, se clasificó al grupo de 47 RN BPEG en función de su alteración Doppler, observando que la concentración de BDNF era significativamente menor en aquellos RN BPEG con el Doppler umbilical alterado comparado con los RN AGA.

Respecto al análisis de Reelina, no se pudieron establecer valores de referencia ni realizar estudio caso-control emparejado ya que la muestra analizada fue insuficiente. No obstante, se analizó la totalidad de la muestra obtenida que constó de 34 sujetos (17 RN AGA y 17 RN BPEG). Con métodos de regresión para el ajuste de variables, no se identificó ninguna variable antenatal modificadora de los niveles de Reelina salvo para el estudio Doppler. De la misma forma que en el análisis del BDNF, se comparó la concentración de Reelina en RN AGA, RN BPEG con vasodilatación cerebral y RN BPEG con alteración Doppler umbilical, observando que la Reelina estaba aumentada en los RN con vasodilatación cerebral de forma significativa.

Estos hallazgos se distancian del mecanismo compensador de la redistribución cerebral y abogan por un efecto deletéreo ya que los RN BPEG presentan una sobreexpresión de Reelina cuando la vasodilatación cerebral se produce.

Por otra parte, la disminución del BDNF va en consonancia con el grado de alteración del crecimiento intraútero y puede considerarse una explicación molecular que inflencie el neurodesarrollo en estos RN BPEG.

Para valorar el impacto clínico de estos resultados sería conveniente realizar una evaluación postnatal de los sujetos estudiados lo que planteamos como una posible línea de investigación.

## Resumen

**ABSTRACT**

---

Low birth weight is an entity affecting 10% of pregnancies. It has been studied the effect of low birth weight on postnatal health, specially its influence on neurodevelopment. The correct classification of the population subserve a more accurate diagnosis. Therefore, the first part of this study consists in identifying antenatal maternal variables influencing birth weight as well as the development of customized population reference curves with these variables, for improved diagnosis of abnormal growth. After retrospectively collecting antenatal birth weights and neonatal variables of births from the HGUGM for 6 years time, its been identified maternal race and parity as antenatal influential factors, besides fetal sex and gestational age, and were included in the reference tables of our population. The model obtained has an  $R^2$  of 0.192.

Moreover, to improve understanding the intermediate processes which cause neurodevelopmental disorder in newborns with growth restriction, two molecules known to be involved in prenatal neurodevelopment has been chosen.

Reelin is an extracellular glycoprotein key in neuronal migration. Recently it is also attributed a role in axonal

## Resumen

guidance and synaptogenesis so its function is not limited to neural migration from the ventricular zone to the cortex. It has been studied in the field of psychiatry as schizophrenia, Bipolar Disorder and Alzheimer diseases, as well as related to learning processes in adulthood. It has also been studied in perinatal rodent models of protein restriction and infection, observing a decrease in concentration of Reelin. Regarding its expression in rodent models of perinatal hypoxia, it has been observed that it is increased, especially in motor and somatosensory cortex and dentate gyrus. However, results are differing depending on the brain area tested. Similarly, it has been studied the levels of Reelin in cord blood from newborns of mothers under antidepressant treatment observing their levels are lower than newborns of mothers naïve. Under these observations, the possibility of detecting Reelin in cord blood, those levels reflecting the brain's production and that hypoxia may be a modifying factor of Reelin expression, we decided to assess the concentration of this molecule in growth restricted and healthy newborns.

The second molecule analyzed is BDNF. A neurotrophin involved in synaptic development, neuronal differentiation, proliferation and differentiation of oligodendrocytes and myelination. It has been diminished in inflammation and

ischemic perinatal hypoxic injury, therefore it is also being studied herein.

For the evaluation of these two molecules it has been prospectively collected a population of 93 healthy newborns and 47 growth restricted newborns.

With the 93 healthy newborns it has been established the BDNF reference values for gestational age. As the pregnancy progresses, the concentration of BDNF in cord blood gets lower, duration of rupture of membranes increased significantly BDNF levels and female newborns had higher levels at birth albeit not significant.

Within the sample recruited a study of 36 case-control pairs matched for gestational age and sex was carried to assess BDNF differences. Lower levels of BDNF in growth restricted newborns was observed although not significant. Observing a downward trend in fetuses with growth restriction, this group based was subclassified dependin on their Doppler findings. It was observed the BDNF concentration was significantly lower in those cases with altered umbilical Doppler compared to healthy newborns.

Regarding the analysis of Reelin, it was not possible to establish reference values or perform a matched case-control study since the sample analyzed was insufficient. However,

## Resumen

the entire sample obtained which consisted of 34 subjects (17 healthy newborns and 17 growth restricted) was analyzed. Using regression models for adjusting variables, no antenatal variable was identified to alter Reelin levels except for the Doppler study. In the same way as in the analysis of BDNF concentration, Reelin levels were compared between healthy newborns, growth restricted with cerebral vasodilation newborns and growth restricted with pathologic umbilical Doppler, noting that Reelin was increased in those with cerebral vasodilation in a significant trend.

These findings distance from the theory of compensating mechanism of cerebral redistribution and advocate a deleterious effect since the growth restricted newborns have an overexpression of Reelin when cerebral vasodilation occurs. Moreover, the decrease in BDNF is in line with the degree of alteration of intrauterine growth and can be considered a molecular explanation that influences neurodevelopment in these disease.

To measure the clinical magnitude of this results, would be of great value a postnatal assesment of the subjects here studied.

## **2. INTRODUCCION**



## 2. INTRODUCCION

---

### **A. Feto con Bajo Peso para Edad Gestacional (BPEG).**

#### DEFINICIÓN DE BPEG:

Uno de los hitos que estudian las alteraciones de crecimiento intrauterino es el objetivo de consolidar su definición. Los primeros intentos fueron publicados por Dunn et al(1) en 1985 para estandarizar una metodología universal de medición y definición de crecimiento intrauterino restringido (CIR), unificando las recomendaciones hechas por la OMS en los últimos años.

EL feto pequeño para la edad gestacional es, inicialmente una observación estadística dentro de una observación poblacional. Tradicionalmente se ha definido como el conjunto de fetos que pesan menos que el percentil 10 de la población. Esta definición dio lugar a un aumento de los fetos constitucionalmente pequeños catalogados como fetos con fallo en alcanzar su potencial de crecimiento, incluyéndolos en una población de alto riesgo cuando el evento importante era identificar al feto que no llega a alcanzar su propio peso óptimo.

## Introducción

Hoy en día, la definición de potencial de crecimiento individual es el punto de inflexión para mejorar el diagnóstico de CIR y diferenciarlos de fetos constitucionalmente pequeños. Esta verdadera diferenciación tiene la importancia de separar los fetos en riesgo de resultados neonatales adversos frente a la población normal.

El potencial de crecimiento individual de un feto es el peso que debe alcanzar. Para evaluarlo con precisión, Gardosi et al(2) identificaron dos puntos clave previamente descritos. El primero, que el peso fetal depende de tres factores. El primer factor es la edad gestacional y el sexo. El segundo las características maternas como la etnia, altura, peso y paridad. El tercer factor depende de aspectos patológicos (como el tabaquismo, la diabetes o la hipertensión del embarazo) que deben ser excluidos en el cálculo de los estándares poblacionales ya que puede reducir la detección de BPEG si se considera normal un feto pequeño debido por ejemplo a la preeclampsia. El siguiente punto clave es que no es el mismo concepto peso fetal estimado que peso neonatal. Hay que tener en cuenta que el peso al nacimiento de los recién nacidos prematuros es inferior al peso fetal estimado para la misma edad gestacional ya que la restricción del crecimiento intraútero es uno de los principales factores independientes de prematuridad, siendo responsable de 23% los partos

prematuros en las mujeres nulíparas(3). Por lo tanto, cuando se evalúa el crecimiento fetal dentro de un estándar poblacional, tiene que realizarse enlazando el peso óptimo predicho a término con una curva de crecimiento intrauterina, normalmente basada en la fórmula de Hadlock que muestra el peso esperado a cada edad gestacional en embarazos normales (4). El uso de estos consejos al evaluar el crecimiento fetal permite identificar hasta un tercio más de casos que comparando el peso del feto con percentiles poblacionales convencionales (5) discerniendo así los fetos que no alcanzan su potencial de crecimiento de los fetos constitucionalmente pequeños.

Cuanto más precisa sea la curva referencial usada para clasificar el peso del recién nacido, más proporción de fetos con retraso de crecimiento tendrá los fetos catalogados como BPEG. Hasta la fecha, no existe un acuerdo entre distintas sociedades sobre la definición del crecimiento intrauterino restringido, existiendo distintos estudios con criterios de selección y definición diferentes, lo que dificultan los meta-análisis y la comparación de resultados(6). En nuestro estudio definimos RN BPEG como aquel que tiene un peso al nacimiento por debajo del percentil 10 de nuestra población y RN CIR aquel que teniendo un peso inferior al percentil 10 presenta algún tipo de alteración Doppler detectada

## Introducción

antenatalmente, como la vasodilatación cerebral o vasoconstricción umbilical. La relativamente reciente diferenciación entre retraso de crecimiento precoz y tardío no se utilizará en nuestro estudio. Algunas investigaciones catalogan como RN CIR precoces a aquellos fetos con afectación antes de las 32 semanas y otras, ya sea por la evolución de la entidad como por su diagnóstico Doppler diferente. Refiriéndose a aquellos RN CIR tardío, a los que estando por debajo del percentil 10 poblacional tienen afectación cerebral sin tener afectación umbilical (7,8).

### INCIDENCIA:

Como observación estadística, nos encontraremos con aproximadamente 5 a 10% de los fetos por debajo del percentil 10 en una población finita. Dentro de este grupo, podemos tener tres patrones principales que pertenecen a tres orígenes diferentes. Cuando se habla de un mal funcionamiento de la placenta, los fetos representan alrededor del 20-30% del total. Si una enfermedad, que no sea insuficiencia placentaria se detecta como responsable, se trata de casi el 10% del total del grupo, considerando al feto como pequeño para la edad gestacional anormal. Los restantes están catalogados como pequeños para la edad gestacional o constitucionalmente pequeños. Estos porcentajes varían en

función de la precisión con que se realiza el estudio de la población estándar, tal y como se ha explicado antes (Figura 1) (9). Cuanto más preciso se hace el estándar poblacional menos fallos en el diagnóstico de BPEG se producen, obteniendo una clasificación correcta y menor proporción de fetos constitucionalmente pequeños sanos.

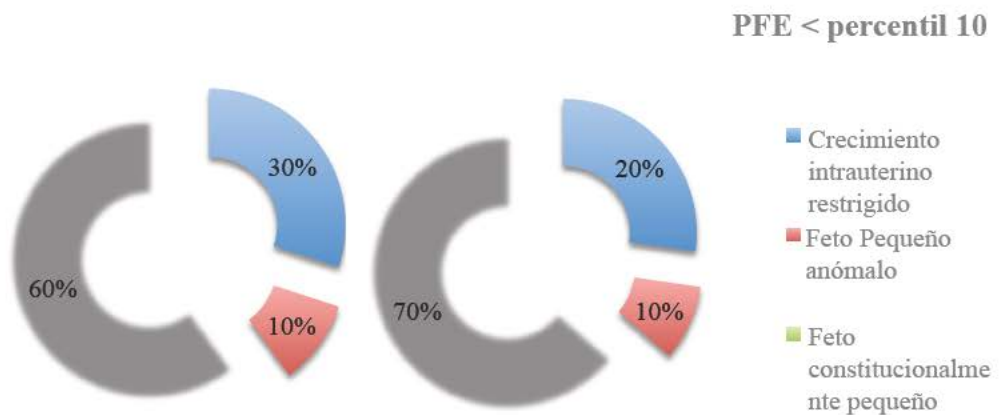


Figura 1: Distribución de los distintos tipos de anomalías de crecimiento intrauterino en la población general en función de los estudios publicados (9).

### ETIOLOGÍA:

Si tenemos en cuenta estrictamente los fetos BPEG, una vez excluido otras patologías implicadas en el crecimiento como infecciones, cromosomopatías, tóxicos o malformaciones, tenemos que entrar en el desarrollo de la placenta en

## Introducción

profundidad. La mayoría de los estudios se centran en la preeclampsia pero como casi la mitad de los retrasos del crecimiento intrauterino se asocian a preeclampsia, se considera que comparten una compleja fisiopatología de la placenta común, excepto por la interacción con el síndrome metabólico materno previo, que está fuertemente asociado a disfunción endotelial sistémico, igual que la preeclampsia (10).

### Implantación Anormal de la placenta:

La invasión inadecuada del citotrofoblasto en las arterias espirales y estroma endometrial es la principal característica del defecto de placentación. Las razones pueden deberse a las teorías inmunológicas y vasculares, ambas interrelacionadas.

El evento inmunológico abarca un desequilibrio entre los linfocitos T helper 1 y 2 a través de las citoquinas. Para un crecimiento adecuado de la placenta y la implantación son predominantes los niveles de citoquinas de la vía Th2(7). En la implantación anormal de la placenta, los niveles de citoquinas dependientes de la vía Th1, como el TNF- $\alpha$ , IL-2 (la mayoría de ellas citoquinas proinflamatorias) se elevan induciendo apoptosis del trofoblasto, impidiendo al citotrofoblasto invadir adecuadamente la decidua y los vasos maternos(11).

Además, la subpoblación de linfocitos llamados Natural Killer uterinos (Nku) juegan un papel importante en la invasión trofoblástica. Ellos no son solo citotóxicos para el citotrofoblasto sino también necesarios para una correcta remodelación vascular materna. Al comienzo de la invasión de la placenta, los Nku representan casi el 70% de la población total de linfocitos y son inhibidos por la unión a través de sus receptores KIR a la placenta y complementos HLA fetales. Los diferentes patrones de expresión de los receptores KIR y complementos HLA fetoplacentarios suponen el exceso de la inhibición o falta de ella, lo que resulta en una invasión placentaria deteriorada y por ende crecimiento intrauterino retardado(12).

El evento vascular se inicia cuando los citotrofoblastos no reemplazan la capa endotelial de los vasos uterinos, lo que les impide transformarse en vasos de baja resistencia. Esta transformación vascular tiene que realizarse para permitir el aumento del flujo sanguíneo uterino durante el embarazo. En la neoangiogénesis placentaria normal y pseudo-vasculogénesis, los citotrofoblastos invasivos disminuyen la expresión de moléculas de adhesión características de su origen epitelial y adoptan un fenotipo de adhesión superficial celular endotelial(13). En los fetos CIR, los citotrofoblastos no

## Introducción

se someten a este cambio y no expresan moléculas de adhesión vascular como el VE-cadherina. Como la invasión placentaria es deficiente no se puede satisfacer la creciente demanda del flujo sanguíneo y provoca la hipoxia trofoblástica(10).

El factor de crecimiento vascular VEGF y el factor de crecimiento derivado de placenta (PlGF), ambos importantes en la vasculogénesis, también están desequilibrados en los fetos BPEG. El sFlt1, que proviene del Flt1, es un receptor endotelial de VEGF y PlGF, se une y antagoniza a éstos. Se ha observado en estudios una invasión deficiente del trofoblasto por una expresión reducida de VEGF y su receptor VEGF R1 (Flt1), así como un incremento en el sFlt1, un fuerte promotor de la disfunción endotelial. Paradójicamente, en la preeclampsia y el CIR se ha observado un nivel disminuido de PlGF(14).

Centrándose a nivel celular y molecular, la apoptosis y la diferenciación ocurre como un equilibrio dinámico durante el desarrollo del trofoblasto normal mientras invade el estroma. En fetos BPEG, las placentas muestran más sensibilidad a la muerte celular en respuesta a la hipoxia/reoxigenación como a las citoquinas y en menor grado que la preeclampsia, al estrés oxidativo(15,16). Es debido al estrés del retículo endoplásmico, que se disminuye la proliferación celular

mediante la inhibición de la síntesis proteica. Mientras que el estrés más severo desencadena la apoptosis(17). (Figura 2)



Figura 2: Esquema del mecanismo celular de la alteración del crecimiento intrauterino por insuficiencia placentaria.

### FISIOPATOLOGIA DEL BPEG:

En la Figura 3 se puede observar de forma esquemática el proceso adaptativo fetal a la insuficiencia placentaria. Cuando la función placentaria está deteriorada, se da un aumento de la resistencia al flujo sanguíneo en vellosidades terciarias. Es

## Introducción

entonces cuando el feto hace uso de varios mecanismos adaptativos tratando de desviar la sangre oxigenada a órganos vitales.

Estos mecanismos pueden ser clasificados como redistribución intrahepática, redistribución cardíaca, redistribución del istmo aórtico-ductus arterioso y redistribución cerebral principalmente. Una disminución del flujo sanguíneo en la vena umbilical ocasiona una disminución de sangre oxigenada que llega al corazón del feto. Este hecho origina que parte de la sangre oxigenada que, en condiciones normales, se dirige al hígado, se desvie al corazón a través del ductus venoso. En circunstancias normales, el 80% de la sangre va al hígado a través de la arteria hepática.

La sangre oxigenada que llega a la aurícula derecha, pasa a través del foramen oval directamente al corazón izquierdo con el fin de suministrar sangre enriquecida al cerebro y las arterias coronarias, provocando una disminución de la proporción del gasto cardíaco fetal que se distribuye a la placenta.

Cuando la sangre oxigenada llega a las arterias cerebrales, éstas tienen una baja saturación de O<sub>2</sub> y la arteria cerebral media se vasodilata.

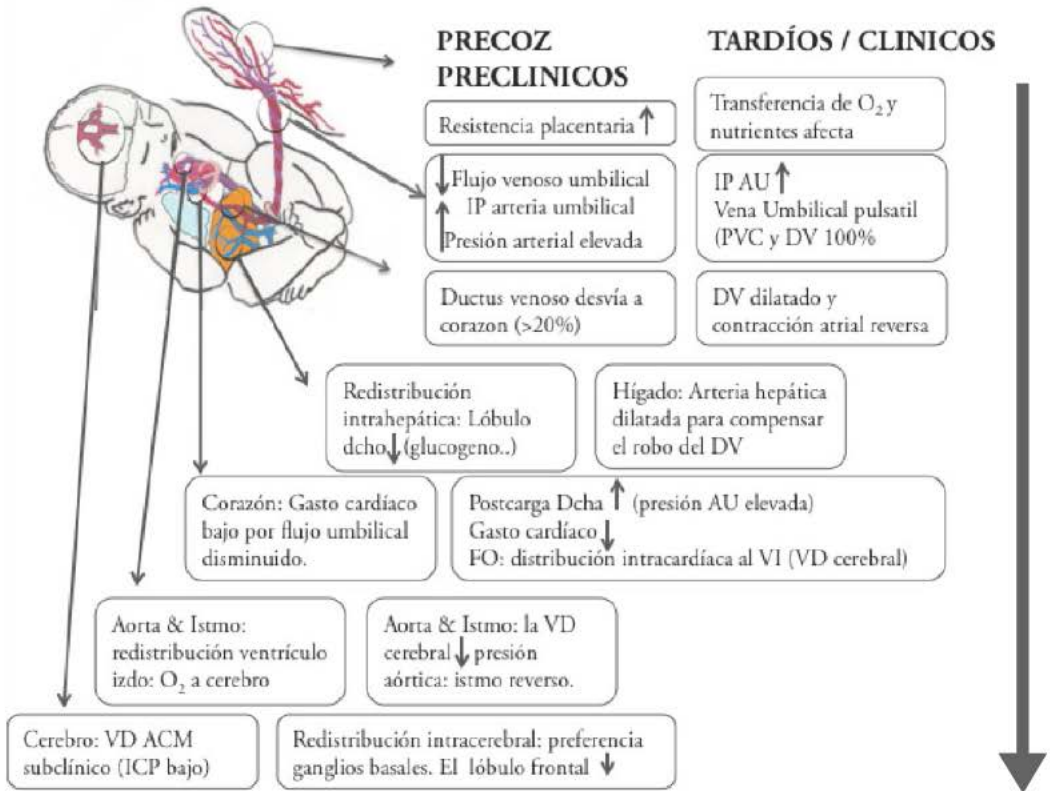


Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de adaptación fetal a la insuficiencia placentaria .

## Introducción

Cuando el DV es marcadamente abierto, la presión se transmite retrógradamente y el Doppler DV muestra una onda a revertida, este aumento de presiones derechas ocasiona una elevación de la presión de la vena umbilical y se convierte pulsátil.

- Signos preclínicos de disfunción placentaria: "redistribución venosa"

La disfunción placentaria temprana tiene varios efectos vasculares potenciales antes de que el Doppler de la arteria umbilical sea patológico. La disminución del flujo umbilical y la reducción de la proporción de gasto cardíaco fetal que se distribuye a la placenta son signos vasculares que preceden el desarrollo del retraso de crecimiento. La disminución del flujo de la vena umbilical conduce a un aumento del shunt ductus venoso produciendo un secuestro hepático hacia el corazón. Además, la redistribución intrahepática ocasiona un robo de perfusión del lóbulo hepático derecho. Esta redistribución venosa es asociada con una regulación negativa del IGF y la disminución de reservas de glucógeno en el hígado, por lo tanto, el tamaño del hígado disminuye y produce el primer signo clínico de retraso del crecimiento fetal: disminución de la circunferencia abdominal antes de que el peso fetal estimado compuesto esté por debajo del percentil 10.

- Los primeros signos del BPEG: “redistribución arterial”

La elevación subclínica temprana de la resistencia umbilical y la disminución de la resistencia cerebral producen una disminución en el índice Doppler cerebroplacentario (ICP). Cuando la obliteración de las vellosidades afecta a aproximadamente un tercio de éstas, el índice de pulsatilidad Doppler umbilical aumenta constantemente, la presión arterial fetal puede aumentar y la transferencia de oxígeno puede disminuir. Una disminución significativa en la saturación de oxígeno y/o un aumento en la presión arterial fetal producen una disminución del índice de pulsatilidad Doppler de la arteria cerebral media. La disminución del ICP también se describe como redistribución porque sugiere una disminución relativa de la poscarga ventricular izquierda favoreciendo una redistribución intracardiaca a través del foramen oval hacia el lado izquierdo del corazón. Del mismo modo, la disminución en el índice de pulsatilidad de la arteria cerebral media sugiere perfusión preferencial al cerebro mediante la autorregulación y en consecuencia se ha denominado redistribución cerebral.

## HERRAMIENTAS DIAGNÓSTICAS DEL FETO CIR/BPEG

### Estrategias de cribado poblacional

Hay varias estrategias para el diagnóstico precoz de los fetos en riesgo de retraso del crecimiento intrauterino. Entre ellas, la evaluación bioquímica de la PAPP-A y la gonadotropina coriónica humana en primer trimestre, la alfafetoproteína e inhibina A en segundo trimestre(18) se han relacionado con la aparición temprana de BPEG y preeclampsia entre otras moléculas. Ninguna de ellas cumplen criterios para un screening poblacional actualmente (19).

Teniendo en cuenta que muchas de las estrategias poblacionales no logran atrapar al feto en riesgo de retraso en el crecimiento, la clasificación correcta del peso de la población es una de las herramientas más importantes para diagnosticar la entidad y mejorar los resultados fetales(5,20,21).

El crecimiento fetal normal y restringido son a primera vista apreciaciones estadísticas. Cuando se hace una clasificación de peso correcto de la población, consideramos fetos con un peso por debajo del percentil 10 como pequeños para la edad gestacional. Si queremos identificar dentro de estos fetos, cuales de ellos están encontrando dificultades para alcanzar su potencial de crecimiento, una vez que la infección y anomalías

genéticas son descartadas, tenemos que profundizar en el estudio, clave para diferenciar entre constitucionalmente pequeños y fetos BPEG.

### Evaluación dinámica del crecimiento fetal

El peso fetal estimado a través de datos biométricos de la cabeza, el abdomen y el fémur tiene una alta validez con hasta 95% de predicción(4,22). Podemos comparar el peso dentro de los estándares de población escogidos colocándolo en un percentil determinado. Hacerlo es como una instantánea de la situación fetal. Aparte del peso estimado en ese instante podemos considerar la curva de crecimiento fetal entre dos exámenes separados por 15 días (23) y considerar la restricción del crecimiento cuando dos evaluaciones ecográficas muestran un peso fetal estimado o una circunferencia abdominal estable pagando el precio de mayores falsos positivos.

Antes de evaluar el Doppler fetal, si clasificamos al feto por debajo del percentil 10 como pequeño para la edad gestacional nos llevará a controlar su crecimiento, ya que los fetos con dificultad para alcanzar su potencial de crecimiento en su comienzo no fueron catalogados como "retraso del crecimiento". Primero mostrarán un bajo peso y más tarde, alteraciones de flujo. Según el momento de aparición de la

## Introducción

noxa sobre el crecimiento, tendremos diferentes tipos de restricción del crecimiento (inicio temprano o tardío) y diferentes problemas según la edad gestacional y en consecuencia, la duración de dicha patología.

### Doppler de la arteria umbilical.

Hasta que un tercio de las vellosidades terciarias no están afectas por vasoconstricción, como se explicó previamente, el Doppler de la arteria umbilical (UA) no se modifica(24,25). En presencia de un flujo de la arteria umbilical normal, la mortalidad perinatal es un evento raro. Esta es la razón por la cual su estudio se incluye en la mayoría de los protocolos prenatales (26) y es un dato esencial para discernir un feto BPEG de uno constitucionalmente pequeño.

Muchos estudios clínicos sobre CIR han establecido que el índice de pulsatilidad de la arteria umbilical aumenta progresivamente y en etapas avanzadas de daño histológico y funcional de la placenta, las velocidades diastólicas están ausentes o incluso revertidas. El Doppler umbilical se correlaciona con niveles de glucosa, aminoácidos y gases en sangre fetal, por lo que puede considerarse una medida subrogada de la función placentaria(27,28). También se ha relacionado con niveles de factores angiogénicos(29), así como ser un importante marcador de resultados adversos

perinatales con valores inferiores de pH arterial y venoso umbilical al nacimiento (hasta un 70% de los fetos con acidosis crónica muestran un Doppler umbilical patológico) y más ingresos en la unidad de cuidados intensivos neonatales con mayor incidencia de distrés respiratorio(28,30).

### Arteria cerebral media.

Cuando el feto tiene un suministro de oxígeno reducido redirecciona el flujo sanguíneo a los órganos principales como el cerebro, el corazón, el bazo y la glándula suprarrenal. En el cerebro, esto se llama redistribución cerebral o "Brain sparing" y se mide en la arteria cerebral media (ACM) principalmente, pero también se ha estudiado en la arteria cerebral anterior. Cuando la saturación de oxígeno cae, las arteriolas se dilatan y el índice de pulsatilidad (IP) disminuye.

Originalmente, la redistribución cerebral se consideró como una herramienta adaptativa, pero hoy en día, los fetos con este mecanismo se considera que tienen funciones psicomotoras subóptimas, considerando dicho mecanismo como una herramienta adaptativa pero no como un mecanismo inocuo(31,32).

### Índice Cerebro-placentario.

Muchos estudios han indicado una correlación entre la modificación del flujo cerebral y trastornos del neurodesarrollo posnatal, con un Doppler umbilical normal. A partir de esa premisa, el índice cerebroplacentario (ICP) se ha utilizado para diagnosticar también fetos de riesgo. El ICP es una relación entre el índice de pulsatilidad de la ACM y la AU. Su valor normal es de más de 1, estando el IP ACM por encima del de la AU. Su aplicación clínica parece ser más útil en fetos con CIR de inicio tardío con normalidad del Doppler umbilical, ya que el ICP puede ser anormal cuando el umbilical y cerebral están todavía en rangos normales. Por el contrario, en fetos con CIR precoz tiene tiempo para desarrollar alteraciones Doppler por lo que la alteración del ICP pronto será superada con alteraciones más severas del Doppler AU. Estudios recientes entre ellos el de Morales-Roselló et al relacionan la alteración del ICP con menor percentil al nacer (189) e incluso con peor resultado gasométrico neonatal (190).

### Líquido Amniótico.

Como marcador crónico, el índice de líquido amniótico se ha relacionado con la perfusión renal. Debido la redistribución de flujo, los riñones fetales disminuyen su flujo sanguíneo y por

ende disminuye la diuresis. Este parámetro está integrado en el perfil biofísico fetal para evaluar el bienestar fetal, pero aislado, es sólo un marcador crónico de CIR sin estar asociado a acidosis o eventos agudos, tan sólo a puntuación del test de Apgar bajo a los 5 minutos (33).

#### Marcadores tardíos del estado Crítico.

Ductus venoso y Doppler venoso.

Este parámetro Doppler se ha considerado tener una buena relación con el estado ácido-base en fetos CIR. Es signo de descompensación preterminal y es el parámetro que se asocia a acidosis neonatal de forma más consistente. Hay muchos estudios que correlacionan el ductus venoso con el estado fetal de nutrientes y pH(34), algunos grupos consideran como un marcador de deterioro neurológico(35), una relación con hemorragia intraventricular (36), lo que refleja el colapso circulatorio terminal que precede a la muerte perinatal(37).

## B. Neurodesarrollo y crecimiento fetal anómalo.

### Neurodesarrollo

De las paredes del tubo neural, que se forma a partir de la placa neural del ectodermo por el proceso de neurulación, se origina el sistema nervioso central. Su desarrollo posterior se basa en tres fases, proliferación, migración y organización.

Globalmente, los trastornos de la neurulación se manifiestan en los defectos del tubo neural, los de la formación del prosencéfalo en los distintos espectros de holoprosencefalias entre otros. La proliferación es la generación de nuevas células (ya sean neuronas o glía) y se produce en una zona particular denominada Zona Ventricular. Cuando ésta es anómala se manifiesta en microcefalias, macrocefalias, hemimegalencefalias y tuberosis esclerosa entre otras.

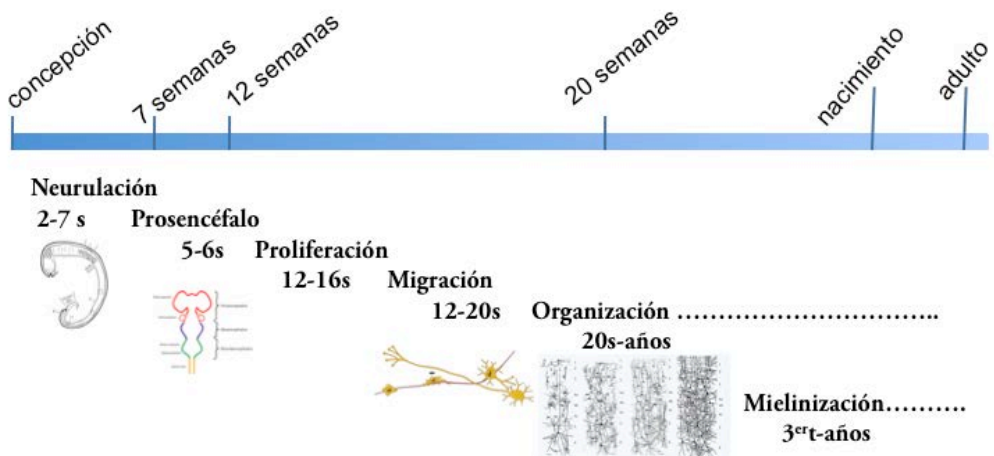


Figura 4. Neurodesarrollo prenatal.

En la Figura 4 se pueden ver las etapas que abarcan las distintas fases de neurodesarrollo embrionario.

Respecto a la migración, se entiende como el movimiento de las nuevas neuronas generadas de la zona ventricular a su destino final. Se da de forma genérica en dos fases, la primera constituye el límite de migración que se establece en la superficie pial y la segunda son varias oleadas hasta que se forman las 6 capas finales resultantes en el córtex desarrollado adulto (Figura 5, *adaptada de Benedikt Berninger y Abcam*).

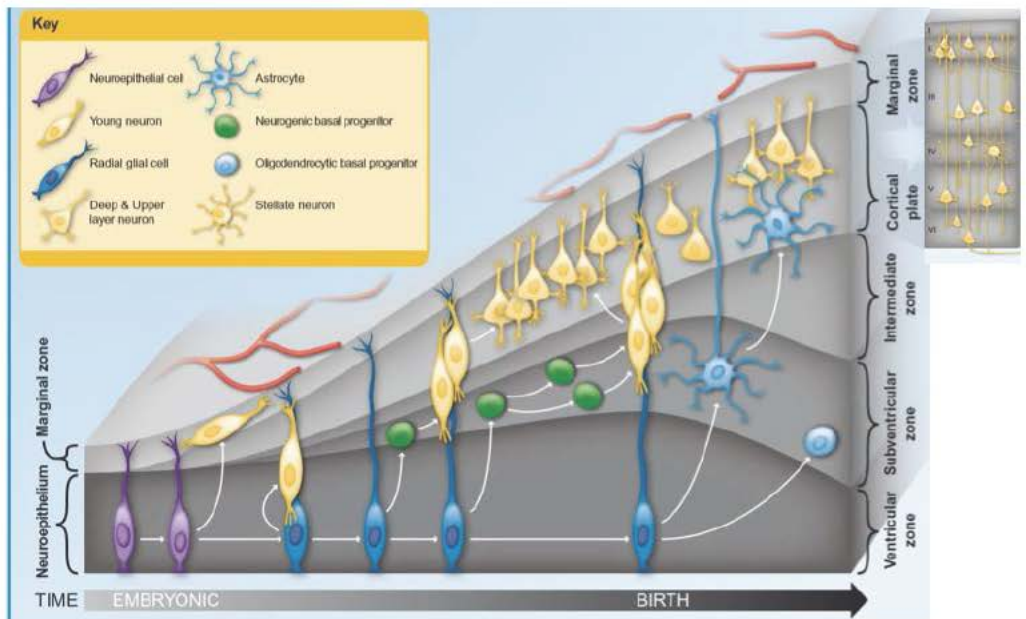


Figura 5. Formación del neocórtex hasta el córtex adulto.

## Introducción

Existen dos tipos básicos de migración (aunque se han descubierto otros tipos de migración para las interneuronas): radial desde la zona ventricular y tangencial desde la eminencia media ganglionar (globus pallidus) pero los mecanismos celulares no son del todo conocidos (Figura 5).

El transporte microtubular, tráfico-fusión de vesículas y el posicionamiento centrosomal son procesos fundamentales en la migración con genes responsables ya identificados (SHh, LIS1, DCX...).

Las alteraciones de la migración se pueden resumir en cuatro grupos: la heterotopia, lisencefalia, anomalías tipo "clobbestone" y heterotopia subcortical (38). La Reelina se ha visto responsable principal de las anomalías Lisencefalia tipo 2 o Síndrome Norman Roberts pero es fundamental también en las última fase de migración (39) (Figura 6 *adaptado de Oscar Marín y Franco* (40) (41)) responsable no sólo de la finalización de la migración en la placa cortical sino también en la laminación y organización neuronal de la corteza.

El resultado final de la migración es la organización del córtex cerebral en sus seis capas neuronales organizadas.

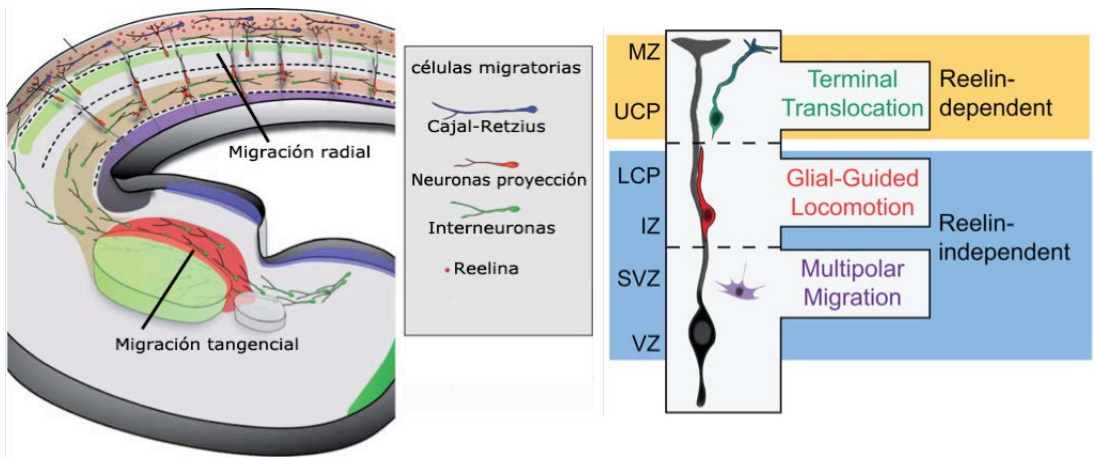


Figura 6. Tipos básicos de migración neuronal

MZ: MARGINAL ZONE  
 UCP: UPPER CORTICAL PLATE  
 LCP: LOWER CORTICAL PLATE  
 IZ: INTERMEDIATE ZONE  
 SVZ: SUBVENTRICULAR ZONE  
 VZ: VENTRICULAR ZONE

Sincrónicamente con dicha fase, se realiza la maduración de la sustancia blanca fetal que se origina en las capas embrionarias de la zona intermedia (IZ). Gracias a la técnica de difusión por resonancia magnética (DWI) donde se evalúa el movimiento de moléculas de agua, se ha podido estudiar la formación de haces de sustancia blanca previos y sincrónicos a la mielinización en fetos (42).

La maduración de la sustancia blanca se da en tres fases, la primera se denomina guía axonal que consiste en la organización de axones tortuosos en haces coherentes, en la segunda se produce una gliosis-mielinización que consiste en la producción de mielina a nivel extracelular y la tercera es la

## Introducción

mielinización propiamente dicha, donde ocurre el envainado de los axones gracias a la mielin-binding-protein. Este proceso de mielinización comienza en el segundo trimestre de la gestación y se da de forma asincrónica en función de los tractos, ya que por ejemplo, la rodilla del cuerpo calloso es la más lenta y tardía en mielinizarse (43). No obstante en el nacimiento el grado de mielinización es escaso, la mayoría se producirá en los dos primeros años de vida prolongándose dicho proceso hasta la edad adulta.

### **Alteración del neurodesarrollo en fetos con alteración del crecimiento (de alteración de la proliferación a “el daño sutil”).**

En las últimas décadas, la relación entre la alteración del crecimiento y el neurodesarrollo anómalo está reflejada en numerosos estudios (44,45), siguiendo la corriente iniciada por Baker en el siglo pasado con su teoría de “Development origins of health and adult disease” (DoHAD) (46).

El mecanismo por el cual se fundamenta la alteración del neurodesarrollo es el déficit de nutrientes y oxígeno debido a la disminución de flujo umbilical de forma crónica, por insuficiencia placentaria, en un momento en el que la proliferación, migración neuronal y sinaptogénesis juegan un

papel importante en el desarrollo del sistema nervioso central (47) sin haber dilucidado aún los mecanismos intermedios que interfieren en la neurogénesis.

Existen tres factores importantes en la modificación del neurodesarrollo. Primero el grado de insulto, hipóxico, leve o severo; segundo la duración del insulto, aguda o crónica; y tercero la cronología del insulto, precoz o tardía. En función de estos tres factores tendremos distintos patrones de alteración del neurodesarrollo postnatal.

La lesión en la fase de proliferación neuronal (12-16 semanas de gestación) da lugar a microcefalia. Esta entidad suele ser el síntoma de varios síndromes genéticos pero también se ha relacionado con la hipoxia neonatal(48), de hecho recientemente se han publicado artículos que relacionan las cardiopatías congénitas que comprometen el flujo cerebral prenatal con el desarrollo de microcefalia (49,50).

Cuando la noxa hipóxica ocurre en la fase de migración, existen distintos fenotipos descritos en la literatura médica en modelos de roedores (51) y en modelos neonatales con diagnóstico prenatal de isquemia por ecografía (52). En fases posteriores de sinaptogénesis y mielinización, también se ha estudiado el efecto de la hipoxia intraútero. Con el desarrollo

## Introducción

de la resonancia magnética y la conectómica, hay varios grupos que estudian las distintas modulaciones de la organización de la sustancia blanca y la sinaptogénesis en los fetos con retraso de crecimiento intraútero(53) (54). Respecto al patrón de sulcación y girificación, se ha visto también por estudios en resonancia magnética y postprocesamiento de imágenes, que los fetos prematuros con alteración del crecimiento presentan un córtex de menor grosor así como un índice de sulcación mayor al compararlo con los fetos de igual semanas de gestación con crecimiento normal(55), así como diferente desarrollo cortical en fetos con alteración del crecimiento intraútero tardío evaluado como la profundidad de las sulcaciones insulares (54).

El estudio del cuerpo calloso (CC) se considera reflejo de la maduración de la sustancia blanca y también se ha estudiado en estos sujetos. Los estudios de Egaña-Ugrinovic et al han observado un menor tamaño del CC junto con la alteración en el neurodesarrollo evaluado con el "Neonatal Behavioral Assessment Scale". Dicha observación persistía incluso con la corrección del índice cefálico(56). Otro estudio del mismo grupo investigador sobre fetos con retraso de crecimiento tardío, observó que la alteración del tamaño del CC y la

sulcación se relaciona con alteración en el metabolismo cerebral evaluado mediante espectroscopía de protones(57).

También se ha observado que los fetos con crecimiento intrauterino alterado presentan una reorganización cerebral adaptativa estudiada con RM, ecografía Doppler y estudio anatomopatológico en animales. Se ha descubierto que los RN con crecimiento alterado y vasodilatación cerebral tienen una redistribución del flujo intracerebral preferencial a los ganglios basales (58) en detrimento de una disminución del flujo frontal (59). En estudios animales se ha observado un menor volumen del hipocampo, así como una menor prolongación dendrítica de sus neuronas (60).

Respecto al estudio cerebral prenatal con ultrasonidos y Doppler en los fetos con crecimiento intrauterino alterado, hay también varios grupos donde evalúan las diferencias entre el momento de afectación y la severidad de éste. Baschat et al publicaron un estudio prospectivo donde observó que el flujo reverso en la arteria umbilical se asociaba a un neurodesarrollo pobre a los dos años de vida postnatal (61).

A partir de allí, numerosos estudios se han centrado en la relación entre la redistribución cerebral vascular (brain sparing effect) y el neurodesarrollo postnatal alterado. Es sabido que

## Introducción

en situaciones de hipoxia en la que la circulación da preferencia al cerebro mediante vasodilatación cerebral, hace unos años se consideraba como protector del daño cerebral. Sin embargo, dicha protección, sobretodo de forma crónica, ha quedado en entredicho por diversos estudios que se centran en el neurodesarrollo del recién nacido más que en las alteraciones hemodinámicas prenatales, evidenciando problemas de neurodesarrollo postnatal a pesar de un flujo umbilical normal (32,56). El estudio PORTO evaluó en una de sus ramas el neurodesarrollo de los RN con vasodilatación cerebral, viendo que empeoraba cuando la redistribución estaba presente, hasta el punto de equiparar el empeoramiento al que se produce cuando aparece flujo reverso o ausente en la arteria umbilical a partir de un Doppler umbilical patológico (62). Los efectos a largo plazo en el neurodesarrollo están siendo todavía evaluados en dicho estudio multicéntrico.

Los estudios que se focalizan en la vasodilatación cerebral y el neurodesarrollo posterior son bastante heterogéneos, teniendo distintas edades gestacionales al nacimiento y evaluación neurológica posterior en distintas etapas con distintas escalas de medición. La alteración cronológica de la redistribución cerebral se ha visto sigue un orden vascular, viendo que la

arteria cerebral anterior y posterior se afecta una semana antes que la arteria cerebral media(63) (64). En general, se ha observado que la redistribución cerebral se asocia a puntuaciones menores en las escalas cognitivas de neurodesarrollo a los 2 años (32), sin embargo respecto a las alteraciones motoras o puntuaciones bajas en escalas precoces, no se han visto diferencias al compararlos con RN sin redistribución cerebral. Esto probablemente refleje la alteración de la perfusión del lóbulo frontal en estos RN y que su consecuencia postnatal sea la alteración en la función cognitiva más que en la motora, tal y como se le atribuye a la corteza frontal(65).

En la Tabla 1 (*adaptada de Meher et al (65)*) se resumen los últimos estudios focalizados en el neurodesarrollo de los RN con redistribución cerebral. Existen estudios donde no se asocia un empeoramiento del neurodesarrollo al asociar redistribución cerebral pero estos estudios son en su mayoría en fetos pretérminos, donde las alteraciones son sobrepasadas por las propia prematuridad.

El general, el estudio del neurodesarrollo postnatal en fetos con crecimiento intrauterino disminuido se ha visto que empeora conforme avanza la edad postnatal a estudio, este hecho es posible debido a que con la madurez cerebral se desarrollan las funciones corticales frontales como la función

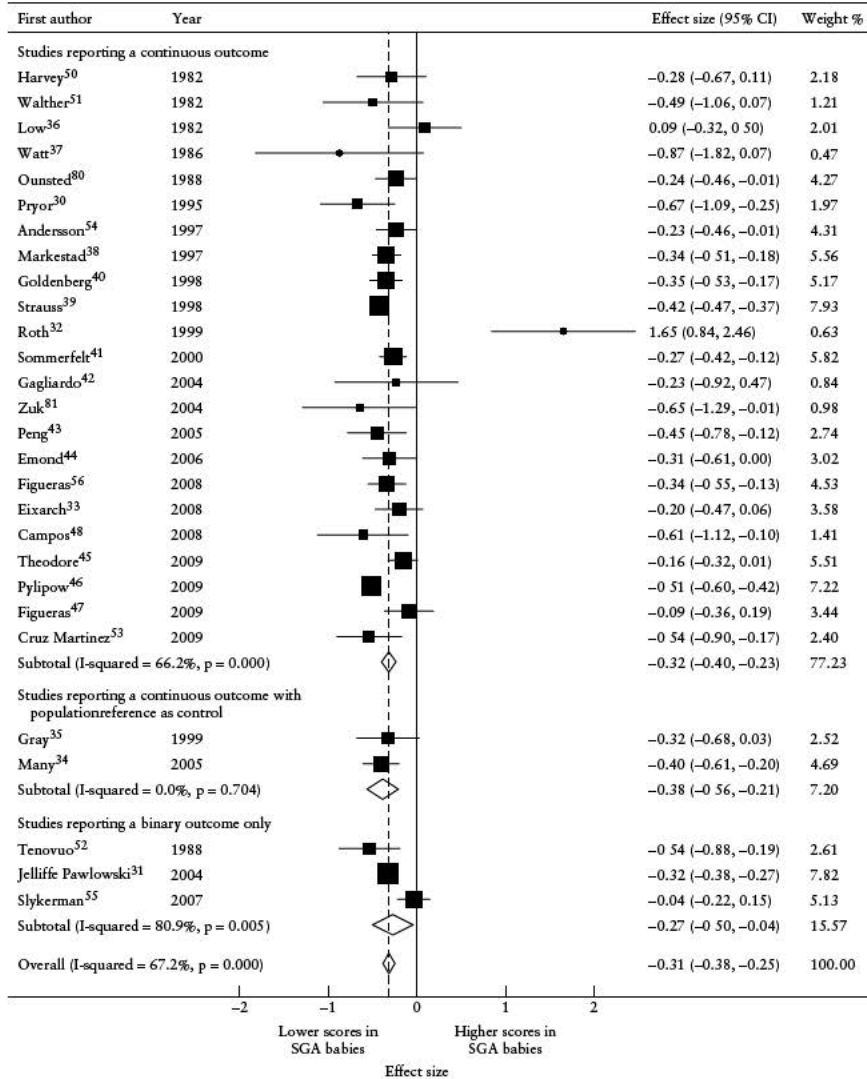
## Introducción

ejecutiva y es entonces cuando las diferencias quedan más evidentes.

Tabla 1. Neurodesarrollo y redistribución cerebral.

<b>Autor</b>	<b>Parámetro estudiado</b>	<b>Resultados</b>
Spinillo et al(66)	ACM IP <p10	No se asocia HIV ni leucomalacia quística en fetos con redistribución cerebral pretérmino.
Nanthakonon et al(67)	ACM IP <p10	No se asocia HIV en fetos con redistribución cerebral pretérminos.
Hobek et al(68)	ICP reducido	Ecodensidad periventricular en BPEG términos y pretérminos con RCIU.
Roza et al (31)	ICP reducido	Neurodesarrollo anómalo (Child behavior checklist).
Rep et al (69)	U/C ratio elevado	Bayley, Townen alterados en pretérminos.
Oros et al (70)	ACM IP < p10	Test de Brazelton alterado (motor, rendimiento neurológico y capacidad de resolución de problemas alterada).
	ACA IP < p10	Neurorendimiento alterado.
Eixarch et al (32)	ACM < 2 DS (Umbilical normal)	Comunicación o solución de problemas alterado
Cruz-Martínez et al (71)	Fraction Volume Cerebral elevado (IP < 2 DS)	Brazelton test reducido (interacción social, atención, función motora y organización).

Tabla 2. Neurodesarrollo en RN con retraso de crecimiento intrauterino (Arcangeli et al).



En resumen, el neurodesarrollo de RN con crecimiento intrauterino retardado se ha visto consistentemente alterado

## Introducción

como se puede ver en la Tabla 2 del meta-análisis de Arcangeli et al (44). Otro reciente meta-análisis observó una mayor alteración que en revisiones previas, sobretodo en RN con RCIU prematuridad y con redistribución circulatoria (Vasodilatación cerebral) con una disminución de 0.7 DS en los test compuestos de neurodesarrollo en RN menores de 35 semanas y de 0.5 SD en los RN de más de 35 semanas (72), esto implica no obstante la importancia de la edad gestacional al nacer.

Existen estudios recientes que se centran en los pasos intermedios entre la noxa prenatal (retraso de crecimiento, redistribución cerebral) y la alteración del neurodesarrollo. Son estudios de ciencias básicas, aunque sobre otras especies (principalmente roedores). Dichos estudios son de gran interés para plantear nuevas intervenciones preventivas y terapéuticas(73) (74). Por nombrar una corriente actual, en animales con retraso de crecimiento intrauterino se han observado mecanismos de inducción y supresión genética que modifican la expresión proteica en determinadas zonas del cerebro (75,76). También existe la hipótesis de que dicha alteración prenatal continua puede llegar a producir cambios epigenéticos en los genes involucrados en la respuesta hipóxica cerebral (77) (78) (76). No obstante, respecto a dicha hipótesis todavía no han sido posible demostrar que

dichos cambios epigenéticos lleguen a afectar la expresión postnatal de proteínas (79).

### C. BDNF

EL Brain Derived Neurotrophic Factor es una proteína descubierta en 1989 incluida en el grupo de las neurotrofinas junto con la Neurotrofina 3, 4 y el Nerve Growth Factor, con las que comparte casi el 50% de sus aminoácidos. Es sintetizada por el gen de mismo nombre, situado en el cromosoma 11 en humanos. Su acción se basa principalmente en la estimulación del receptor específico Tirosin kinasa B (TrK-B) pero al ser secretado antes de su clivaje en la forma pro-BDNF, es entonces cuando tiene afinidad con otro receptor, el p75. Estas dos formas de BDNF tienen acciones distintas: cuando el pro-BDNF estimula el receptor p75 tiene acción apoptótica y cuando el BDNF está en su forma real es cuando estimula el receptor específico TrK-B, que es su función principal.

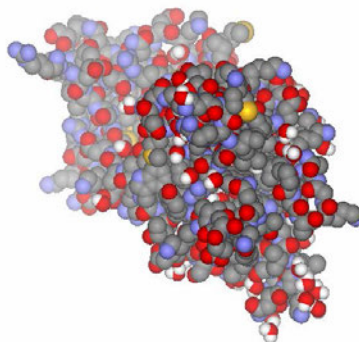


Figura 7. Estructura 3D f BDNF (Protein Data Bank by Microswith. Wikicommons)

La existencia de estas dos formas es una manera de regular la acción del BDNF(80,81).

Su papel en el neurodesarrollo prenatal se fundamenta en la estimulación y mantenimiento del desarrollo sináptico (plasticidad sináptica) y la regulación de la supervivencia y diferenciación neuronal. También interviene promocionando la proliferación y diferenciación de las células precursoras de los oligodendrocitos y en la mielinización(82) que se expresa como crecimiento axonal y maduración cortical.

Diversos estudios en animales han demostrado distintos papeles del BDNF en el SNC tanto prenatal como postnatal como la potenciación de la plasticidad neuronal sobretodo en el hipocampo, relacionándolo con la memoria y el aprendizaje. También se ha implicado al BDNF en la neuroprotección reduciendo la apoptosis celular ante insultos externos y promoviendo poblaciones específicas de neuronas tanto en el sistema nervioso central como en el periférico.

Otro papel del BDNF investigado en el SNC es la relación con la Reelina, estas afirmaciones se basan en la observación de que el BDNF actúa como un regulador negativo de la expresión de la Reelina, por lo que indirectamente también controla la organización de estructuras laminadas cerebrales (83).

## Introducción

También se ha observado que el BDNF tiene una acción angiogénica muy similar al VEGF y al PlGF, siendo capaz de movilizar precursores del sistema hematopoyético para promover la neovascularización (84) (Figura 8).

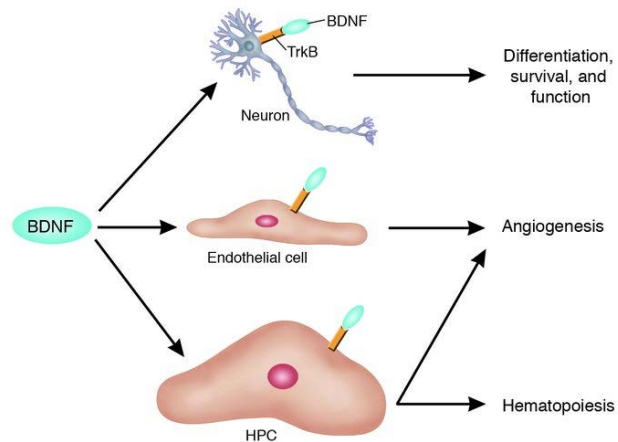


Figura 8. Función del BDNF mas allá del SNC9 (Dan G. Duda et al. J Clin Invest. 2005;115(3):596-598. Pleiotropy of tissue-specific growth factors: from neurons to vessels via the bone marrow).

En la Tabla 3 a modo de resumen se expone a día de hoy, los estudios más relevantes sobre las funciones estudiadas del BDNF.

Tabla 3. Resumen de la actividad del BDNF estudiada. H: humanos, R: ratones. I: intervención M:mutación O:Observación

AUTOR	ACCION	TIPO DE ESTUDIO	ESPECIE	DIANA
Ramos-Cejudo et al(85) Xiao et al(82)	Oligodendrogé-nesis, mielinización, conectividad	I M	R	
Leal et al (86)	Potenciación a largo plazo (memoria y aprendizaje) en adultos	O	H	SNC
Katoh-Semba et al(87)	Neurogénesis vía proliferación neuronal	I	R	
Burkhalter et al (88)	Aumento del metabolismo neuronal cortical	I	M	
Donovan et al (89) Hong et al (90)	Angiogénesis	I	R	NO SNC

Se ha descrito que la expresión de BDNF está modificada por diversas condiciones prenatales como la infección materna, preeclampsia, las horas de bolsa rota, la maduración corticoidea, el tratamiento con sulfato de magnesio(91) o el hipotiroidismo, sobretudo en fetos de menos de 32 semanas de gestación(92,93).

## Introducción

También hay estudios que relacionan los niveles elevados de BDNF con el retraso mental y autismo (94) y niveles inferiores, con la hemorragia periventricular neonatal secundaria a lesiones hipóxico-isquémicas(95).

Los recientes estudios postnatales se centran en el análisis de la metilación de su gen sobretodo en sujetos con depresión, esquizofrenia o trastorno bipolar, así como las variantes polimórficas de la composición de su gen en la evolución y respuesta a tratamiento de distintas enfermedades psiquiátricas que no se detallarán en este estudio por estar fuera de objetivo.

## D. REELINA

La Reelina es una glicoproteína de la matriz extracelular que interviene en el desarrollo de las estructuras laminadas del cerebro en los vertebrados, principalmente en el neocórtex, médula espinal, hipocampo y cerebelo (96). Consta de 3461 aminoácidos con un peso molecular relativo de 388 kDa. Su estructura tridimensional de homopolímeros fibrilares está formada por varias bandas proteicas que van de 450 Kda a 80 Kda, con una zona bisagra central. Es procesada en el entorno extracelular por metaloproteinasas en dos locus N-terminal y C-terminal y una vez secretada no se aísla entera, si no por partes.

Su gen RELN situado en el brazo largo del cromosoma 7 humano (7q22) tiene una secuencia homóloga entre roedores y humanos del 87%.

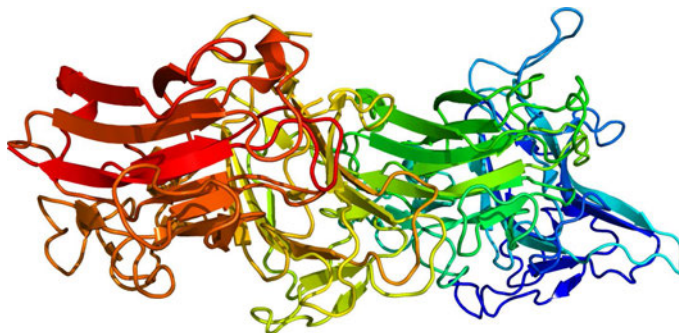


Figura 10. Estructura cristalográfica de la Reelina por Boghog. Wikicommons.

## Introducción

Es secretada en grandes cantidades por las células de Cajal-Retzius, situadas en la superficie glial de la futura corteza, lugar donde finaliza la migración radial y se organizan las capas corticales. Se le considera responsable durante el neurodesarrollo prenatal de la migración neuronal radial y laminación cortical. Es particularmente abundante en zonas muy ricas en sinapsis, en las que existe evidencia de remodelación y plasticidad constantes. En el neocórtex humano y en el hipocampo encontramos una banda especialmente marcada en el neuropilo de capa I así como somas sueltos que la contienen en capas I y II principalmente. Su ausencia completa provoca que las neuronas se coloquen de forma desordenada en la corteza cerebral y cerebelosa, dando origen a la lisencefalia. No solo se ha visto su función en la migración y laminación, también se ha estudiado su función en fenómenos de crecimiento y guiado axonal, ya que se ha detectado en interneuronas de la sustancia blanca (97).

El insulto hipóxico letal estudiado en embriones de ratones se ha visto que modifica de forma más intensa la expresión de los genes implicados en la función sináptica y la transmisión neuronal, como el gen de la Reelina (98). En la edad adulta, la Reelina también tiene su papel, regulando la maduración del

receptor glutamatérgico NMDA, ya que interviene en la composición de sus subunidades. Es sabido que modulando la respuesta de este receptor se aumenta su capacidad de inducir potenciación a largo plazo, una de las bases celulares de muchos procesos de aprendizaje y memoria (99).

Una vía de señal como ésta, implicada por una parte en desarrollo y por otra en la modificación plástica del cerebro durante la vida postnatal, es un buen campo de estudio donde buscar respuestas para las alteraciones del neurodesarrollo. Situaciones con una posible alteración parcial por el déficit de nutrientes y oxígeno intraútero o ante un insulto excitotóxico como la inflamación o infección materna que estimule la apoptosis celular y modifique la expresión del gen de la Reelina es una hipótesis formulada por estudios diversos (100,101).

Diversas patologías previamente relacionadas con estos tipos de insultos cerebrales se han visto asociadas a una alteración en la expresión de Reelina en estos pacientes. En 1998 se descubrió que, en pacientes con esquizofrenia, el porcentaje de Reelina era alrededor de la mitad de los controles, medida mediante cuantificación de su ARN mensajero en cerebro postmortem (8). Por el contrario, se observó que la Reelina en

## Introducción

plasma de pacientes afectos de esquizofrenia estaba aumentada respecto a los controles (102). En los pacientes con autismo y trastorno bipolar, otras patologías que también se han visto relacionadas con esta vía de señalización, se ha encontrado una disminución de Reelina en sangre periférica y en los cerebros estudiados postmortem.

En la presencia de un insulto cerebral, se ha visto que la producción de Reelina aumenta, supuestamente como mecanismo compensatorio, tal y como observó Courtés en ratas adultas tras insulto isquémico cortical (103).

Sabiendo que la alteración en la producción de Reelina se relaciona con determinadas condiciones patológicas del NP, se han intentado encontrar factores que pudieran determinar esta modificación de la expresión génica. Ghiani recientemente postuló que los efectos proinflamatorios en ratas modificaban el clivaje de la Reelina ya secretada en la matriz extracelular, encontrando cambios en la relación de los distintos pesos moleculares de Reelina (100).

El déficit de oxigenación y nutrientes al que están expuestos los fetos con BPEG podría estar relacionado con cambios en la expresión de Reelina, este efecto podría ser paralelo, bimodal o gradual al compromiso hemodinámico del feto con BPEG.

Existen estudios publicados donde se evidencia la correlación existente entre los niveles de Reelina en sangre periférica y en muestras cerebrales postmortem viendo que cuando se da disminución de Reelina en tejido cerebral, estaba disminuida también en sangre periférica aunque no así todavía en fetos o recién nacidos (104).

### MECANISMO MOLECULAR DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA REELINA

La Reelina se liga a proteínas y receptores neuronales como el ApoER2, el VLDL-R y la integrina  $\alpha 3\beta 1$ . La unión a dichos receptores induce su agrupamiento y por consiguiente, la oligomerización de la proteína Dab-1 en el lado citosólico de la membrana plasmática. Esto conlleva a la activación de la familia Tyrosin-kinasa y Fyn-kinasa que provoca la fosforilación de dicha proteína Dab-1 a modo de retroalimentación positiva. Todo esto es el inicio del sistema de señalización en las células efectoras (como las células piramidales corticales), base para la formación de filopodias, elementos ricos en actina, primordiales para la migración, ordenación celular, neurotrofismo e incluso cicatrización (Figura 11).

## Introducción

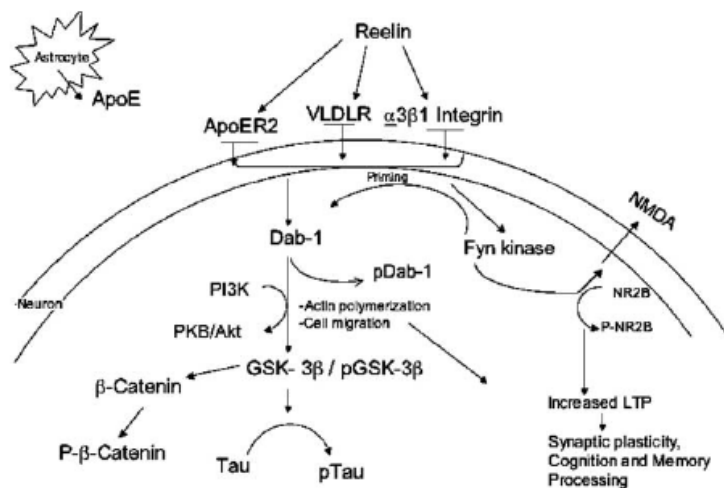


Figura 11. Vía de señalización de la Reelina. Fatemi et al.(9)

## FUNCIÓN

Durante el periodo embrionario, la Reelina es sintetizada y excretada por neuronas Cajal-Retzius en la corteza cerebral y en el cerebelo, por neuronas de la capa granular radial. En ambos casos, se secreta a la matriz extracelular.

También se puede encontrar Reelina en otras zonas no corticales, como en el núcleo motor romboencefálico, neuronas preganglionares simpáticas, neuronas autónomas de la médula espinal, así como en otros tejidos extracerebrales como en las glándulas suprarrenales, plasma pobre en plaquetas e hígado, cuestionando su papel fuera del sistema nervioso central(105).

Su papel principal es en la migración neuronal radial. Una vez que la migración neuronal finaliza, alrededor de la primera mitad de la gestación, las células de Cajal-Retzius degeneran y en la segunda mitad de la gestación se puede encontrar Reelina como patrón fetal y adulto, presináptica y postsináptica, localizándola en los terminales axonales, espinas dendríticas... Tiene un papel no del todo conocido y aún en investigación ya que se le ha relacionado, a parte de con la migración y laminación cortical, con la maduración de dendritas y espinas dendríticas así como con la plasticidad sináptica(106).

### PATOGENIA OCASIONADA POR LA REELINA

La importancia del estudio de la Reelina en la última década radica en la postulación de hipótesis que la relacionan con alteraciones psiquiátricas como la esquizofrenia, el autismo, el trastorno bipolar, la depresión mayor, la epilepsia del lóbulo temporal o incluso el Alzheimer(39). Dichas hipótesis se formulan con los cambios observados en los niveles de Reelina del tejido cerebral tanto cortical como de la sustancia blanca y

## Introducción

el hecho de que su función a parte de la corticogénesis, no está del todo descubierta.

La ausencia completa de la Reelina ocasiona una enfermedad grave de la migración neuronal denominada Lisencefalia tipo 2. Debido a la mutación del gen RELN, las neuronas Cajal-Retzius tanto de la capa pial como del cerebelo no la secretan y las neuronas generadas en la zona ventricular a pesar de poder migrar a capas superiores, pierden la organización debido a la ausencia de la citoarquitectura o andamiaje que tendría que haber sido creado por la Reelina. Por este motivo, las neuronas pueden no finalizar en la capa pial y llegan a la zona marginal y siendo incapaces de adoptar la estructura de las 6 capas neuronales del córtex.

También se ha estudiado el papel de la señalización de la Reelina en la plasticidad sináptica en modelos animales, así como los cambios en el aprendizaje de ratones heterocigotos para la mutación del gen RELN, con niveles de Reelina disminuidos pero no ausentes. También, en función de la localización de la alteración de los niveles de Reelina (hipocampo, lóbulo temporal) se han observado alteraciones del aprendizaje y comportamiento animal diferentes (107).

Respecto a su papel en el desarrollo de enfermedades neuropsiquiátricas, es un campo todavía en expansión. En la Tabla 4 (*adaptada de Fatemi(107)*) se muestran los estudios publicados en la última década sobre el papel de la Reelina en dichas enfermedades.

Tabla 4. Papel de la Reelina en patología.

<b>Enfermedad</b>	<b>LCR</b>	<b>Sangre</b>	<b>SNC</b>	<b>Referencia</b>
<b>Autismo</b>	-	↓	↓	Fatemi et al. 2002 (108) Fatemi et al. 2005(109)
<b>Esquizofrenia</b>	No relacionado	↑	↓	Ignatova et al. 2004 (110) Fatemi et al. 2001b(111) Guidotti et al. 2000 Impagnatiello et al. 1998 (112) Eastwood and Harrison, 2006(113)
<b>Trastorno Bipolar</b>	-	↓	↓	Fatemi et al. 2001b (111) Guidotti et al. 2000 (114) Torrey 2005 (115)
<b>Depresión Mayor</b>	-	↓	Sin cambios	Fatemi et al. 2001 (111) Guidotti et al. 2000 (114)
<b>Lesión Hipóxico-Isquémica (roedores)</b>	-	-	↑	Komitova 2013 (74) Courtes 2011 (103)



### **3. HIPOTESIS Y OBJETIVOS**



### **3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---

#### **2.1 HIPÓTESIS**

##### **2.1.1. HIPOTESIS CONCEPTUAL-OPERATIVA**

Los recién nacidos pequeños para su edad gestacional presentan distintos niveles de BDNF y Reelina en sangre de vena umbilical que los que tienen peso adecuado para su edad gestacional.

El grado de afectación del crecimiento intraútero, marcado por la alteración Doppler antenatal influye en los niveles de BDNF y Reelina de vena umbilical de fetos pequeños para la edad gestacional.

Tanto la neurotrofina BDNF como la proteína Reelina son unos marcadores de fallo de crecimiento intraútero en fetos pequeños para la edad gestacional.

## **2.2 OBJETIVOS**

### **2.2.1. OBJETIVO PRINCIPAL**

1. Comparación de los niveles de Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) y Reelina en sangre de cordón entre recién nacidos con bajo peso para la edad gestacional (BPEG) y recién nacidos con peso adecuado para su edad gestacional (PAEG) emparejados por edad gestacional y sexo.
2. Para la consecución de este objetivo principal, ha sido *prioritario* poder realizar el cálculo del percentil customizado de nuestra población a estudio a partir de la población de referencia, actualizada a dicho periodo de estudio.

### **2.2.2. OBJETIVOS SECUNDARIO**

1. Creación de niveles de referencia de BDNF en función de la edad gestacional.
2. Creación de niveles de referencia de Reelina en función de la edad gestacional.
3. Comparación de los niveles de BDNF y Reelina entre la totalidad de los fetos BPEG y PAEG.
4. Evaluación de los niveles de Reelina y BDNF en función del Doppler fetal antenatal.

## **4. MATERIAL Y METODOS**



## 4. MATERIAL Y MÉTODOS

---

### 4.0 . DISEÑO Y FASES DEL ESTUDIO.

Todos las fases del estudio referidos en esta Memoria se han realizado siguiendo consecutiva o simultáneamente el esquema de la Figura 12.

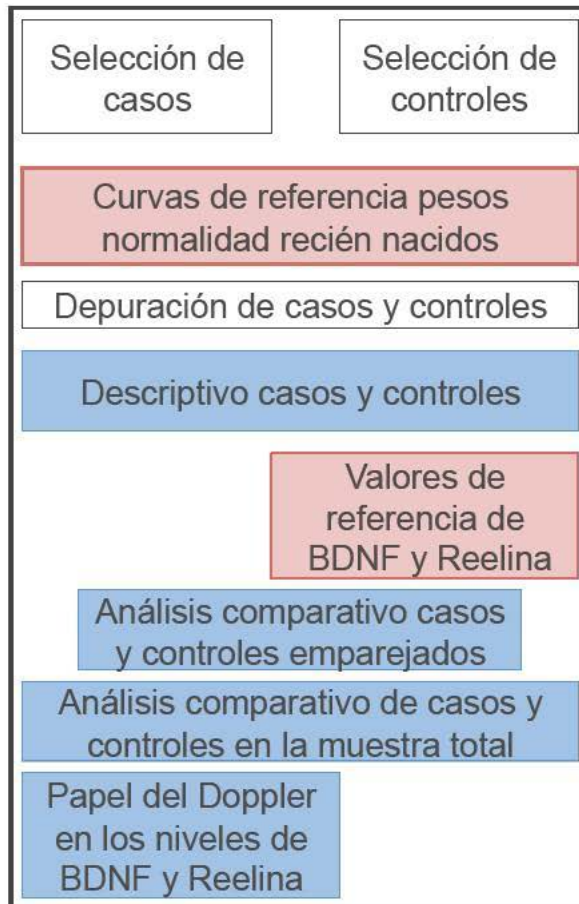


Figura 12. Fases del estudio

#### 4.1. CREACIÓN DE CURVAS DE PESO NEONATAL CUSTOMIZADAS EN NUESTRA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Para la creación de curvas de referencia de peso neonatal propias customizadas se recogió una cohorte retrospectiva comprendida entre Octubre 2005 y Diciembre de 2011 de 49.969 partos.

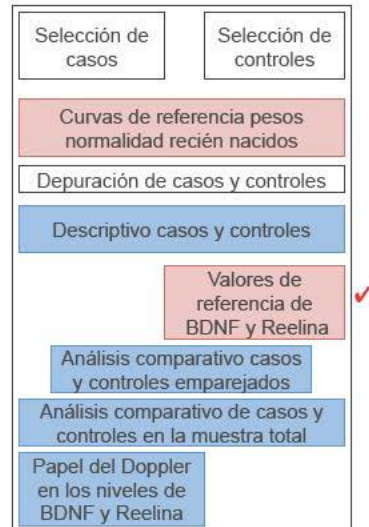
##### 1. Sujetos

Tomando en cuenta las gestaciones únicas sin patología atendidas durante el periodo de estudio, contamos con una cohorte de 34497 gestantes.

##### 2. Variables

Las variables analizadas fueron, edad materna, paridad, raza, edad gestacional en semanas cumplidas, sexo fetal, patología materna y fetal clasificada, patología fetal presente o ausente, tipo de parto y mortalidad perinatal.

Se recogieron las variables edad materna en dos formas, continua y segregada para tres grupos principales (adolescente < 18 años, normal: 18 a 39 años y añosa > 39 años).



La paridad se recogió también en dos formas, discreta y segregada en nulíparas, primíparas y multíparas para el punto de corte de 3 partos o más.

Las razas se clasificaron en Caucásica, Magrebí, Asiática, Africana, Sudamericana y otras (principalmente compuesta por Oceanía). También se optó por analizar la variable raza segregando la raza Caucásica en española y no española.

La patología materna se clasificó en 18 categorías en función del sistema afecto, incluyendo diabetes, hipertensión-preeclampsia, infecciones, enfermedades reumatológicas, autoinmunes, nefrourológicas, cardíacas, ginecológicas, digestivas, hematológicas, malos antecedentes obstétricos y técnicas de reproducción asistida.

Todas las gestaciones incluidas en la descripción de curvas de referencia de peso neonatal o peso óptimo al nacimiento, se dataron con ecografía de primer trimestre mediante la longitud cráneo-caudal o en su defecto, en el segundo trimestre mediante el diámetro biparietal. La edad gestacional se corregía si la diferencia era mayor a 7 días respecto a la ecografía del primer trimestre o el ciclo menstrual de la paciente era irregular.

## Material y Métodos

El peso fetal se obtuvo en las primeras 12 horas del nacimiento.

Para aumentar la calidad de los datos, el resto de las variables se revisaron y en su caso se recogieron en la fecha del alta, en el momento de firmar el informe hospitalario por parte del Servicio de Pediatría y de Obstetricia.

Los criterios de exclusión fueron cualquier tipo de patología materna, o fetal, gestación múltiple, técnicas de reproducción asistida, mortalidad perinatal y gestaciones sin datación comprobada por ecografía.

### **3. Metodología estadística cálculo percentil customizado.**

La descripción de las curvas de referencia de pesos neonatales se realizó con regresión lineal múltiple y se seleccionaron las variables con un comando de extensión diseñado para la selección de la mejor ecuación predictiva, siguiendo el criterio de  $R^2$ . Ante pequeñas diferencias de  $R^2$ , se consideró también el modelo que mejoraba el valor de  $C_p$  de Mallows.

En el modelo de regresión lineal, se comprobaron las variables seleccionadas mediante el método eliminatorio hacia atrás con criterios de selección de entrada  $PIN = 0.05$  y salida  $POUT = 0.1$ .

El análisis de los residuales comprobó cumplían los criterios asumidos en una regresión, siendo de distribución normal por el gráfico Q-Q.

También se evaluó las distancia de Cook y la tolerancia, siendo estas menores de 0.005 y mayor de 0.9 respectivamente para las variables seleccionadas. El programa estadístico utilizado para el análisis fue SPSS 20.0.

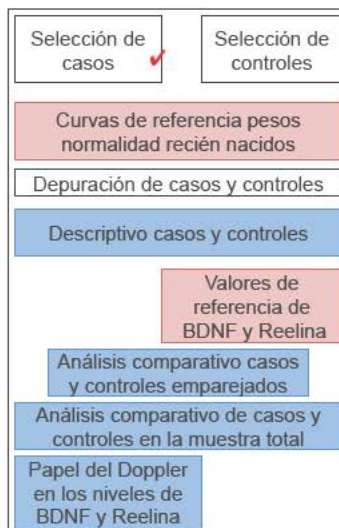
La aplicación del modelo obtenido sobre nuestra población a estudio se realizó mediante los cálculos de los percentiles con la siguiente fórmula:

```
COMPUTE Z=(PESO / optimal_birthweight - 1) / CV Pearson
```

## 4.2 COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) Y REELINA EN SANGRE DE CORDÓN ENTRE RECIÉN NACIDOS PEQUEÑOS PARA SU EDAD GESTACIONAL (BPEG) Y LOS QUE TIENEN PESO ADECUADO PARA SU EDAD GESTACIONAL (PAEG).

### 4.2.1. Tipo de estudio y sujetos a estudio.

Se ha diseñado un estudio de casos y controles a partir de los fetos atendidos en la Maternidad del Hospital Universitario Gregorio Marañón entre el 9 de Noviembre 2009 y el 31 de Diciembre 2011.



Población fuente y definición de casos y selección:

Se realizó el reclutamiento de las gestantes atendidas en la unidad de ecografía diagnosticadas de caso, cumpliendo los criterios de inclusión y exclusión de la tabla 1 y cuyo parto fue atendido en nuestro centro.

Los casos se denominan en este estudio fetos "*con bajo peso para la edad gestacional*" (BPEG) y se refieren a fetos procedentes de gestaciones únicas diagnosticados inicialmente de crecimiento inferior al percentil 10 por los percentiles poblacionales publicados por Figueras et al, (116) mediante estudio biométrico ecográfico, nacidos en nuestro centro con independencia de la edad gestacional al nacimiento y que poseen alteración Doppler, ya sea por vasodilatación cerebral o elevación del índice de pulsatilidad de la arteria umbilical, según las tablas de referencia de Arduini (117) y Bastchat (28) respectivamente.

Selección de controles, fetos con peso adecuado para su edad gestacional (PAEG):

Se realizó reclutamiento de las gestantes cuyo parto fue atendido en nuestro centro durante el periodo de estudio y periodo de reclutamiento de los casos. Cumplían los criterios de inclusión y exclusión descritos en la tabla 5 y diagnosticados inicialmente de crecimiento adecuado para la edad gestacional (> percentil 10) por los percentiles poblacionales publicados por Figueras et al.

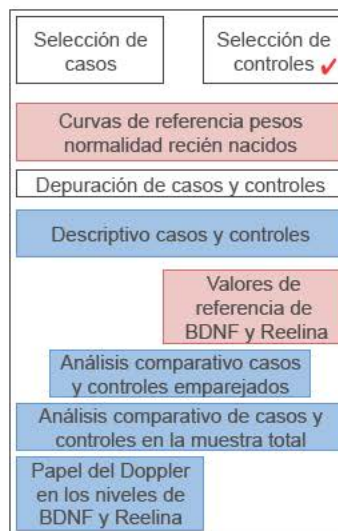
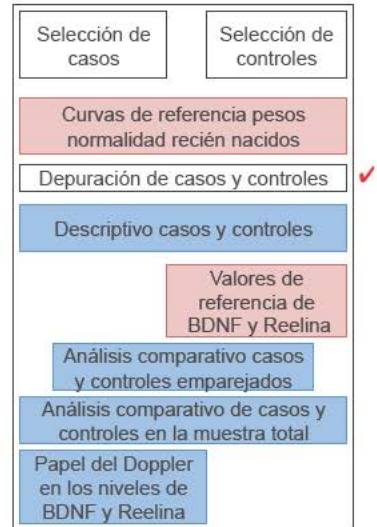


Tabla 5. Criterios de Inclusión y Exclusión de los sujetos a estudio.

	<b>Exclusión</b>	
<b>Sujetos control (PAEG)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Gestación única de <math>\geq</math> de 34 semanas en el momento del parto.</li> <li>• Mal control gestacional (&lt; de 3 visitas).</li> <li>• Datación gestacional &gt; 20 semanas.</li> <li>• Corioamnionitis.</li> <li>• Defectos congénitos (Malformación fetal o alteración genética).</li> <li>• Consumo de drogas ilícitas o alcoholismo durante el embarazo.</li> <li>• Negativa a firmar el consentimiento informado.</li> </ul>	
	<b>Exclusión</b>	<b>Inclusión</b>
<b>Sujetos caso (BPEG)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Mal control gestacional (&lt; de 3 visitas).</li> <li>• Datación gestacional &gt; 20 semanas.</li> <li>• Corioamnionitis.</li> <li>• Defectos congénitos (Malformación fetal o alteración genética).</li> <li>• Consumo de drogas ilícitas o alcoholismo durante el embarazo.</li> <li>• Negativa a firmar el consentimiento informado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Percentil customizado &lt;10 según nuestras tablas poblacionales.</li> <li>• Doppler arteria umbilical &gt; percentil 95 o arteria cerebral media &lt; percentil 5 según tablas de Arduini y Baschat respectivamente.</li> </ul>

### Aplicación de curvas de peso neonatal customizadas de

nuestra población A partir de las curvas obtenidas en el apartado A y con la intención de contrastar la categorización de los grupos caso control, se aplicó en cada recién nacido el percentil customizado de nuestra población.



#### **4.2.2. Variables clínicas y bioquímicas a estudio.**

Variables clínicas maternas: edad materna (años cumplidos), paridad, antecedentes obstétricos (abortos de repetición como igual o más de 2, preeclampsia previa, CIR previo), patología materna actual (diabetes, preeclampsia, hipertensión o hipotiroidismo, todas ellas con o sin tratamiento), tratamiento farmacológico de la patología materna (levotiroxina, insulina, labetalol).

Variables ecográficas fetales (solo para fetos BPEG): edad gestacional y percentil de peso fetal al diagnóstico, IP Arteria Umbilical, IP Arteria Cerebral Media, (últimos valores Doppler previos al nacimiento y dicotomizados en casos de ser superior o inferior a los límites de la normalidad).

Variables clínicas obstétricas: más de 12 horas de bolsa rota, tratamiento con sulfato de magnesio profiláctico para eclampsia, tipo de parto (eutócico, instrumental, cesárea sin trabajo de parto o cesárea con trabajo de parto).

Variables clínicas neonatales: edad gestacional a nacimiento en semanas cumplidas, sexo, peso en gramos y percentil customizado de peso neonatal tomado en paritorio. Maduración pulmonar, valor del Test de Apgar (al minuto y a los 5 minutos), pH arterial de cordón umbilical, tipo de reanimación, ingreso en UCIN, hemorragia Interventricular según la clasificación de Papile (118).

Variables bioquímicas de la vena umbilical: hemograma (hemoglobina, hematocrito, leucocitos, neutrófilos, monocitos), cortisol , BDNF y Reelina (dos pesos moleculares de 180 y 320 kDa y total).

#### **4.2.3. Tipo de variables en relación al tipo de estudio.**

Variables resultado (variable dependiente): En algunos análisis, la variable resultado fue la defensoria de caso y control (BPEG y PAEG respectivamente), aunque para otros análisis se utilizó como variable resultado la mediana de BDNF y Reelina.

Variables explicativas (variables independientes): tal y como se definieron en el apartado anterior, el resto de variables analizadas quedan supeditadas al análisis distributivo en función de caso control o de la distribución de las moléculas BDNF y Reelina.

#### **4.2.4. Métodos de laboratorio.**

##### RECOGIDA DE LAS MUESTRAS, PROCESAMIENTO INICIAL Y ALMACENAJE

Las muestras fueron recogidas en el momento del parto previo al alumbramiento y depositadas en tubos estándar clínicos que contenían heparina de Litio. La sangre se centrifugó dentro de la primera hora del nacimiento en el servicio de Bioquímica, por el técnico de laboratorio de guardia. Se dividieron en

alícuotas Eppendorf, un mínimo de uno y un máximo de tres, codificados con el identificador de estudio y almacenados en gradillas en un ultracongelador Thermo Scientific Fisher Forma a  $-86^{\circ}\text{C}$ .

La descongelación se realizó a temperatura ambiente y sólo en una ocasión, no se realizaron congelaciones posteriores. Se siguió las recomendaciones de Lugli et al(119) en el almacenaje hasta la creación de los geles y la disposición de los anticuerpos se realizó hasta un máximo de 5 años.

#### DETERMINACIÓN DE BDNF EN VENA UMBILICAL POR METODOLOGÍA DE ELISA

La determinación de BDNF se llevo a cabo mediante el ensayo Quantikine Human BDNF Immunoassay (R&D Systems).

Este ensayo es un ELISA en fase sólida de tipo sandwich. Los anticuerpos antiBDNF se encuentran inmovilizados en la superficie de los pocillos de la microplaca. Estos anticuerpos capturan el BDNF contenido en las muestras, controles y calibradores y tras lavar se añade un segundo anticuerpo frente a BDNF que lleva unida una enzima que tras la adición de un sustrato químico emitirá una señal. La intensidad de

## Material y Métodos

esta señal será proporcional a la concentración de BDNF contenida en la muestra.



Foto 1. Analizador de ELISA.

## DETERMINACIÓN DE REELINA EN VENA UMBILICAL POR METODOLOGÍA DE WESTERN BLOT

Preparación de la muestra:

Se diluyó 1 ml de cada plasma problema en 30 ml de tampón de carga, buffer Laemmli compuesto por Tris 2 M pH 6.8, urea 6 M, b-mercaptoetanol 15 %, azul de bromofenol a 0.003% y SDS al 3 %. Las muestras se desnaturalizaron por calor durante 3 minutos a 95°C.

La separación de proteínas se realizó por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (Bio-Rad) al 6 % en el sistema

Mini Protean (Bio-Rad) durante 130 minutos a 120 voltios y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore) por transferencia húmeda empleando el sistema Mini Trans-Blot Cell (Bio-Rad) durante 15 horas a 15 voltios a 4°C.

El bloqueo de la membrana se llevo a cabo con PBS 0.1% Tween 20 (PBSt) con 5% de leche en polvo durante 1 hora a temperatura ambiente, tras lo que se lavó con PBSt antes de incubar toda la noche a 4°C con el anticuerpo anti-Reelina aa 164-189 mreelin, clone 142 (Calbiochem, Millipore) diluido en PBSt con 1% de leche. Tras la incubación se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBSt y finalmente se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario IgG de cabra frente a Ig de ratón marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (Santa Cruz Biotechnology) preparado en solución de bloqueo. Tras otros tres lavados de 5 minutos con PBSt, la membrana se reveló por quimioluminiscencia empleando el reactivo ECL (Bio-Rad). La detección de señal se realizó mediante el sistema Image Reader LAS-4000 (Fujifilm) y el análisis densitométrico se llevó a cabo empleando el software ImagenJ. Se obtuvieron datos para dos pesos moleculares distintos, 180 kDa y 320 kDa, así como el total de la muestra. Se analizaron por separado y en total, tal y como refleja la literatura(119) (120).

#### **4.2.5. Recogida de los datos y análisis estadístico.**

##### **a) Cálculo del tamaño muestral.**

La evaluación de la diferencia de los niveles de reelina en sangre de cordón en fetos afectados requiere el contraste bilateral de la hipótesis nula de igualdad entre la diferencia de medias en grupos independientes. Mediante la utilización de la herramienta Epidat 4.1 y asumiendo varianzas desconocidas pero iguales, se calculó una diferencia de medias estandarizada entre afectados y no afectados de 0.621, con un nivel de confianza de 95%, una potencia de 80% y una proporción de casos y controles de 1, se precisarían 41 pacientes por grupo, estimando una pérdida de 5%, se necesitaran 44 pacientes por brazo, siendo un total de 88 pacientes para el estudio de la molécula de Reelina.

##### **b) Recogida de datos:**

Se utilizó un formulario para la recogida de la información de este estudio, donde se recogieron los datos maternos, fetales y ecográficos, al reclutamiento de la paciente y los datos perinatales tras el parto (ver anexo III).

Todas las pacientes reclutadas tanto en la Unidad de Diagnóstico Prenatal de nuestro centro como las procedentes

del paritorio firmaron el consentimiento informado de participar en este trabajo (ver anexo I).

Reclutamiento de los casos: Los datos procedentes de la Unidad de Diagnóstico Prenatal fueron obtenidos por los profesionales quienes realizaban el estudio ecográfico y reclutaban a cada paciente aplicando los criterios de exclusión e inclusión. Posteriormente la doctoranda era informada de la inclusión de cada paciente en el estudio.

Reclutamiento de los controles: Los datos de las pacientes controles eran reclutadas en la Unidad de Paritorio por el personal que atendía el parto, instruidos en aplicar los criterios de inclusión y exclusión.

Tanto para los casos como para los controles, los datos perinatales fueron obtenidos por los obstetras que se encontraban de en la Unidad de Paritorio en el momento del parto. Los datos neonatales fueron obtenidos a partir del informe de neonatología y registrados por la doctoranda.

Por último señalar que todos los datos se recogieron de forma codificada y fueron introducidos en una base de datos Microsoft Access 2003 diseñada para este fin y el análisis

estadístico posterior se llevó a cabo con el paquete estadístico SPSS 20.0 (SPSS Inc). Se consideró significativo un valor de  $p < 0.05$  teniendo siempre presentes los intervalos de confianza. Pese a alcanzar o no dicha significación, se tomó en cuenta la magnitud del efecto encontrado y la aplicabilidad clínica del mismo.

### **c) Análisis estadístico:**

#### **Análisis descriptivo de las variables del estudio.**

Con el fin de describir las características de la población de gestantes (casos y/o controles) incluidas en el estudio se evaluaron de forma descriptiva las variables, tanto predictoras como de resultado. En función de la naturaleza de cada variable, éstas se detallan en porcentaje, para las variables cualitativas y en parámetros de centralización (media/mediana), junto a parámetros de dispersión (desviación típica, rango intercuartílico u otros) para las variables cuantitativas.

#### **Análisis estadístico para el cálculo de los valores de referencia del BDNF y Reelina en fetos PAEG.**

Para el cálculo de los rangos de referencia de los niveles de BDNF entre las 37 y las 41 semanas fue obtenido siguiendo el

procedimiento descrito por Royston y Wright (121). Este método supone que, en cada edad gestacional, el BDNF tiene una distribución Gaussiana con una media y desviación típica y que en general estas varían levemente con la edad gestacional\*. La estimación de funciones de la media y la desviación típica se basa en el análisis de regresión. Si la desviación aumenta considerablemente con la edad gestacional, es más fácil modelar el logaritmo del BDNF que los valores crudos. Para conocer esto, es necesario evaluar el ajuste de la distribución de los datos por regresión lineal, logarítmica, cúbica y cuadrática. Después del estudio del comportamiento de la desviación típica, se evalúa el de la media mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados. Primero se aplica un modelo de regresión cúbico. Si éste no es significativamente diferente de cero, entonces se estudia el modelo cuadrático y así sucesivamente. Este proceso se repitió hasta que no se eliminaron más términos del modelo.

Cuando la medición tiene aproximadamente una distribución Gaussiana, los valores ajustados tras la regresión de los residuales absolutos sobre la edad gestacional, son una estimación de la curva de DT. Si no existe una tendencia con la edad gestacional, la DT se estima como la DT de los residuos sin escala. Si hay una tendencia, entonces se

## Material y Métodos

necesita un análisis de regresión polinomial de la misma forma que para la media.

La hipótesis de una distribución de Gauss se prueba mediante el uso de los Z-score. Un gráfico de probabilidad normal de los Z-score da una idea de la medida en que los valores siguen una distribución Gaussiana.

Esto se puede verificar formalmente por el test de Shapiro-Wilk y todos los valores P utilizando ambas pruebas fueron superiores a 0.05. Un gráfico de las puntuaciones Z contra la edad gestacional debe ser distribuida al azar alrededor de cero. Si aparece una tendencia o existe una desviación de una distribución de Gauss, entonces todo el análisis debe hacerse de nuevo después de una transformación adecuada de las mediciones.

Sin embargo, en este estudio este no es el caso. Una vez que el modelo satisfactorio ha sido determinado y dependiendo de la utilidad de las curvas percentilares para el intervalo de referencia, se calculan sustituyendo las expresiones para la media y la DT en la siguiente ecuación:

$$\text{percentil} = \text{media} + KDT$$

donde K es el percentil correspondiente de la distribución gaussiana. Si la estimación de las curvas se realiza en la escala logarítmica, debe ser considerado.

### **Análisis de la relación de los valores del BDNF y Reelina por edad gestacional y otras variables clínicas perinatales.**

Mediante un modelo de regresión lineal multivariante se realizó el ajuste de los valores medios de BDNF y Reelina por edad gestacional en relación al sexo fetal y el presentar o no más de 12 horas de bolsa rota, dado que dichas variables han sido analizadas previamente en otros estudios.(92)

Como criterio de ajuste del modelo que describe dicha asociación, tomaremos en cuenta la significación de la variable introducida en el modelo y/o el cambio del coeficiente beta de la edad gestacional en el cálculo del valor medio de cada molécula > 10%(122).

### **Análisis de calidad de la muestra en sangre de cordón en fresco.**

Dado que el análisis de BDNF y Reelina fueron realizadas en un segundo tiempo (tras congelación de las muestras) y para constatar que dichas muestras analizadas previamente a la congelación carecían de artefactos, se describió la distribución de la hemoglobina (gr/dL), hematocrito (%), leucocitos

## Material y Métodos

(nº/uL) , linfocitos (%) y neutrófilos (%) por edad gestacional en los fetos PAEG.

### **Análisis de la asociación entre las variables predictoras y de resultado en el estudio de casos y controles emparejados.**

#### Distribución de las variables

Previamente al análisis estadístico se comprobó si los datos a analizar seguían una distribución normal dentro de cada grupo y si las varianzas eran homogéneas, en cuyo caso se aplicó un método paramétrico. En los casos en los que las variables no cumplían los requisitos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se utilizaron métodos no paramétricos.

#### Tests para valorar el grado de independencia

##### a) Métodos paramétricos:

Se estudió la posible asociación (en función del grado de dependencia/independencia) entre determinadas variables predictoras y de resultado, con la intención de dar respuesta a

los análisis que tienen lugar durante la fase inferencial. Para ello utilizamos los métodos:

- Chi cuadrado de Pearson:

La prueba de Chi-cuadrado, se emplea cuando estamos interesados en determinar la independencia de dos variables cualitativas.

- Correlación lineal de Pearson:

Este coeficiente permite estudiar la relación lineal entre dos variables cuantitativas. Dicha relación será nula (asociación lineal inexistente) si  $r=0$ , aumentando a medida que el valor de  $r$  se aproxima a 1 o a -1. El signo del coeficiente  $r$  indica el sentido de la asociación, siendo directa cuando el signo es positivo e inversa cuando es negativo.

En el cálculo de la fuerza de asociación entre variables cuando una de ellas sea una variable cualitativa de múltiples categorías, para ajustar mejor el resultado se intentará agrupar al menor estandarizado de categorías posibles.

- T de Student para muestras independientes:

Se utiliza para demostrar la independencia de una variable cuantitativa de resultado en función de una variable independiente binaria. El parámetro que se compara son las medias de una determinada variable entre dos grupos binarios.

## Material y Métodos

### b) Métodos no paramétricos

Las pruebas estadísticas no paramétricas se usan cuando la muestra es pequeña o la distribución de los datos no cumple características de normalidad. Siguiendo los criterios de selección de cada una de las variables, aplicaremos: el análisis de comparación de medianas, Kurskal-Wallis, la suma de los rangos de Wilcoxon, el test de Chi cuadrado de Pearson, el análisis de correlación de Spearman u otras.

### Análisis de efecto

#### a) Análisis univariado

El análisis univariado mediante técnicas de regresión logística lineal se ha utilizado para analizar la correlación de las variables clínicas materno-fetales con las diferentes variables respuesta en cuando a la visualización o no de los cortes. Se ha exigido un nivel de significación  $p \leq 0.05$ . No obstante cada modelo máximo se ha conformado teniendo en cuenta todas aquellas variables con relevancia clínica o con significación  $\leq 0.20$ .

#### b) Análisis multivariado

El análisis multivariado mediante técnicas de regresión logística múltiple se ha utilizado para determinar y ponderar el

efecto de cada variable que se introduce tras el análisis univariado en relación al conjunto de variables.

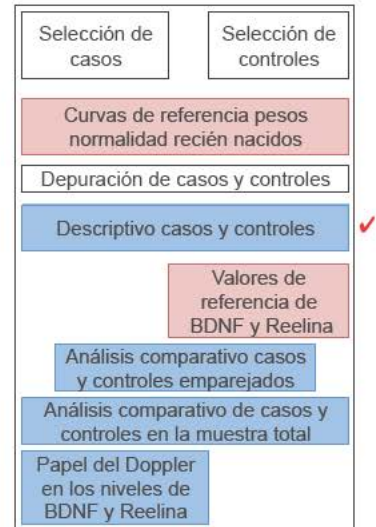
Como primer paso se ha obtenido el modelo máximo, conformado teniendo en cuenta todas aquellas variables con relevancia clínica o con significación  $\leq 0.20$  en el análisis univariado.

Posteriormente, mediante "back step list wise" se han obtenido los modelos óptimos para cada variable respuesta. La selección de estos modelos se ha regido prioritariamente por el principio de parsimonia, pero teniendo en mente siempre el fin último de este trabajo: conseguir modelos con la mejor capacidad predictiva.

Los resultados se presentan en coeficiente B (coeficiente de regresión), que representa la tasa de cambio de la variable resultado por cada unidad de cambio de las variables a estudio (variables predictoras).

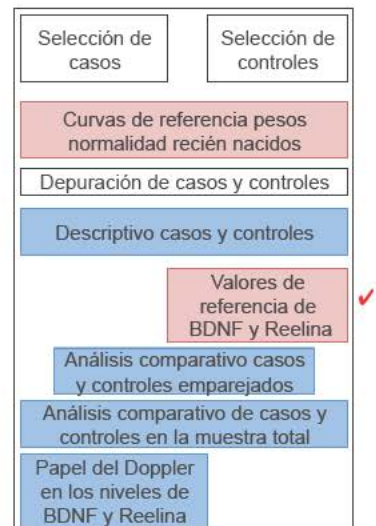
#### 4.2.6. Análisis descriptivo individualizado de los Casos y Controles.

Tomando en consideración las variables tanto clínicas materno-fetales y perinatales como las variables bioquímicas detalladas en el apartado 2, se realiza un análisis descriptivo individualizado de los casos y los controles.



#### 4.2.7. Determinación de los valores de referencia de BDNF y Reelina en sangre de cordón de los fetos PAEG

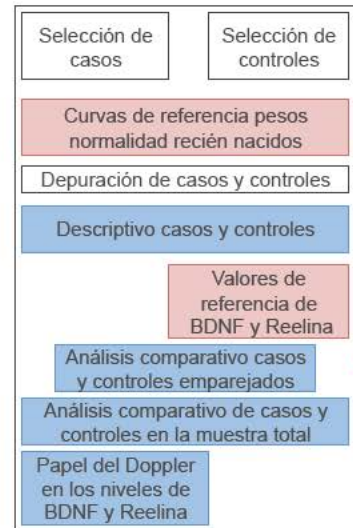
Los valores de referencia para los niveles de BDNF y Reelina en sangre de cordón umbilical de los recién nacidos PAEG por edad gestacional (entre la 34 y la 41 semanas), se describen siguiendo la metodología propuesta por Royston (121). De igual forma, a modo de control de las muestras obtenidas, se describe la distribución de la



hemoglobina, hematocrito, leucocitos, linfocitos y monocitos en sangre de cordón umbilical de los recién nacidos PAEG en función de la edad gestacional.

#### 4.2.8. Estudio comparativo de las variables clínicas materno-fetales y perinatales así como las bioquímicas en sangre de cordón umbilical para casos y controles emparejados por edad gestacional y sexo.

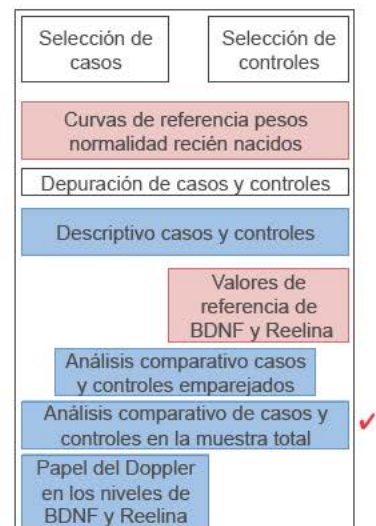
Tras la descripción de las variables explicativas de forma individual en cada uno de los grupos (casos y controles) y con la voluntad de realizar un análisis comparativo, se realizará un emparejamiento 1:1 de los casos y controles por edad gestacional ( $\pm 7$  días) y sexo. Con la intención de poder analizar el máximo número de variables, se seleccionó para cada caso los controles que tuviesen el máximo número de variables recogidas. Para garantizar la normalidad de los casos-control, se consideraron aquellos que tuvieran mas de 34 semanas de gestación. La comparación se realizó utilizando tests de



independencia paramétricos y no paramétricos en función de la distribución de las variables.

#### 4.2.9. Análisis comparativo de casos y controles en la muestra total: Uso de otro tipo de estudio para el análisis comparativo de las variables bioquímicas en sangre de cordón.

Debido a que el objetivo principal del estudio es el de conocer el comportamiento de BDNF y Reelina tanto en casos como en controles, la dificultad de emparejar los casos sobretodo por debajo de 34 semanas, nos lleva a utilizar otro tipo de estudio para analizar dichos comportamientos así como su posible asociación con otros factores previamente relacionados con el caso como el patrón hemodinámico fetal.

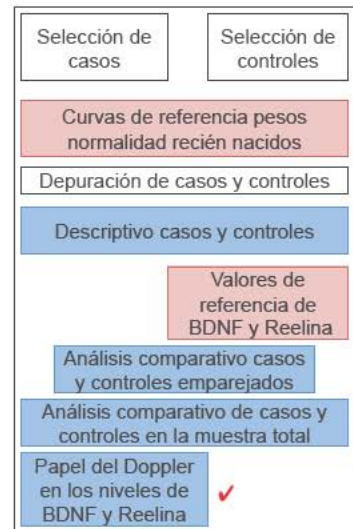


Concretamente, para el análisis de ambas moléculas, como alternativa se recurrirá al análisis de regresión lineal multivariante corrigiendo los coeficientes beta en función de

las variables identificadas en el apartado de la normalidad de BDNF como influenciadoras.

#### 4.2.10 Papel del Doppler en los niveles de BDNF y Reelina en fetos BPEG.

Tal y como se explicó en el apartado Introducción, el retraso de crecimiento fetal intrauterino se estudia mediante el Doppler antenatal. Por este motivo, se analiza el papel de los patrones diferenciales del Doppler fetal sobre los niveles de BDNF y Reelina de forma multivariada corrigiendo los coeficientes beta en función de las variables identificadas en el apartado de la normalidad de BDNF como influenciadoras.



*Todos los resultados con decimales se exponen siguiendo la norma ISO 80000-1 del año 2009, donde recomienda el uso del punto como signo separador de los decimales. En ninguno caso se usa separador de miles.*



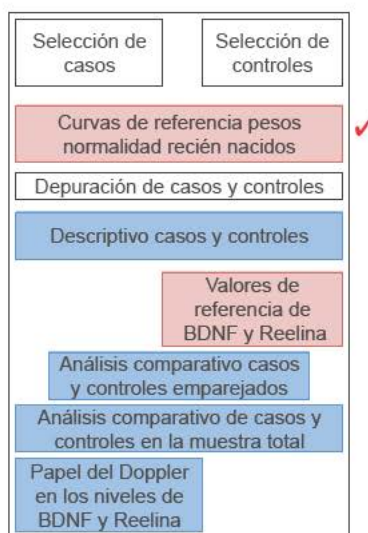
## **5. RESULTADOS**



## 5. RESULTADOS

### 5.1. CREACIÓN DE CURVAS DE PESO NEONATAL CUSTOMIZADAS PROPIAS.

En la Figura 13 se muestra el diagrama de flujo de los pacientes finalmente incluidos para realizar las curvas customizadas de peso neonatal. Tras la eliminación de un 4.4% de casos por datos incompletos y la exclusión de un 27.8% de casos por incumplimiento de criterios, la población final para la estimación de las curvas de referencia fue de 34.497.



En la Tabla 6 se muestran las características de la población utilizada para crear las curvas customizadas de peso neonatal.

## Resultados

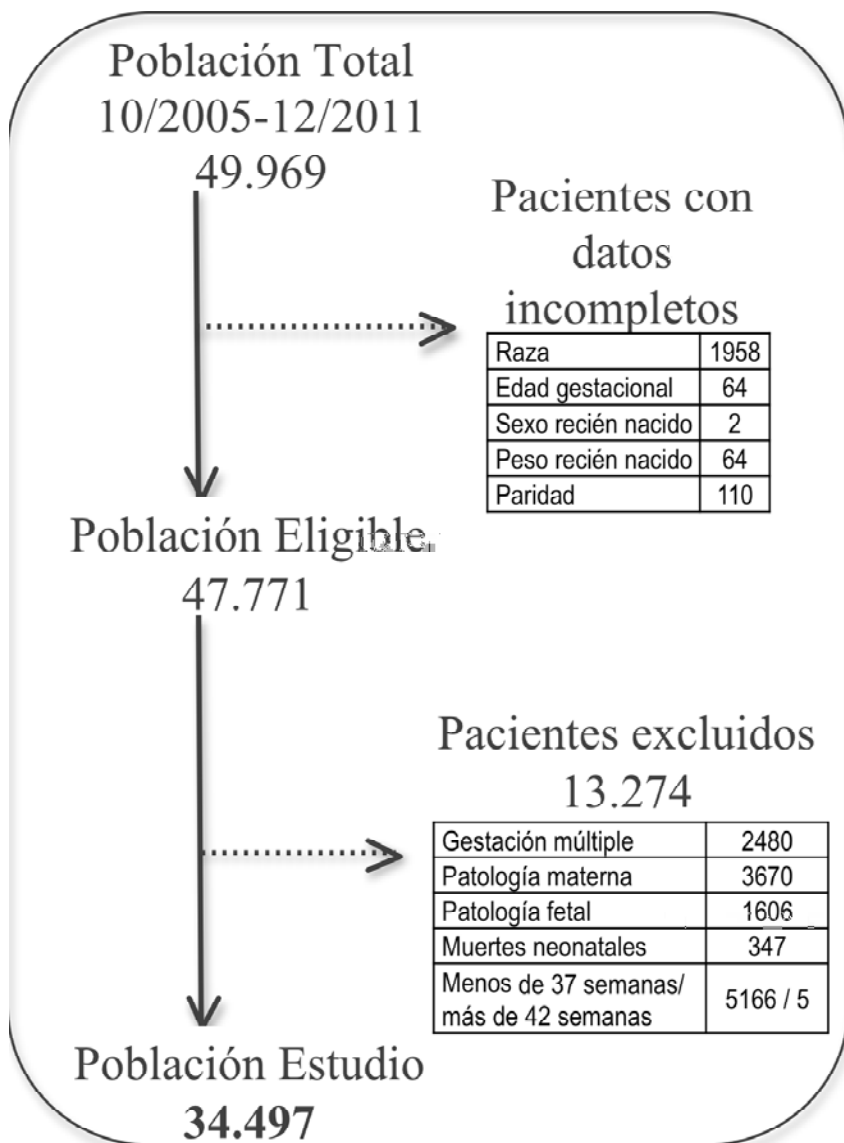


Figura 13. Diagrama de flujo de la selección de los pacientes para la creación de curvas de normalidad

Tabla 6. Características de la población utilizada para crear los percentiles customizados de peso neonatal.

<b>Tabla 6. Población incluida N=34497</b>	<b>N(%) / M(DT)</b>
Peso recién nacido	3292 (430)
Edad materna	30.5 (5.7)
Edad gestacional	39.4 (1.2)
Primiparidad	19497 (56.5)
Raza/Etnia	
Caucásica	3547 (10.3)
Española	21250 (61.6)
Sudamericana	7445 (21.6)
Árabe	961 (2.8)
Áfricana	244 (0.7)
Asiática	868 (2.5)
Otras	181 (0.5)

Mediante regresión lineal se creó un modelo predictivo de peso óptimo al nacimiento con variables maternas y fetales. El modelo de regresión lineal obtenido optó por 4 variables, excluyendo la edad materna tanto continua como segregada en los tres subgrupos antes descritos. Tampoco se incluyó la aportación cuadrática ni cúbica que describe la relación del peso con la edad gestacional ya que el  $R^2$  fue 0.131 para la relación lineal y solo mejoró el modelo a 0.135 para la relación cuadrática.

## Resultados

En el análisis de la variable raza materna, se valoraron dos posibilidades, una clásica con las razas anteriormente descritas y la otra segregando la raza caucásica en Española y el resto. Se encontró que el modelo que diferenciaba la variable raza española mejoraba un 0.5% comparado con el modelo que incluía la raza española dentro de la caucásica (de  $R^2$  0.187 a 0.192) pero con una marcada mejoría del Cp de Mallows (de 230.94 a 12).

En la Tabla 7 se exponen los coeficientes obtenidos para cada variable incluida, como constante a efectos comparativos, corresponde al caso mas prevalente: mujer nulípara gestante de 40 semanas de un feto hembra. En la Tabla 8 se expone la matriz de los percentiles para dicho caso.

Para un uso práctico de la matriz de los percentiles en los diferentes supuestos de raza, paridad y variables fetales, se creó una aplicación informática donde el cálculo del percentil introducido según dichas variables se realiza de forma automática. En el anexo VII se expone una copia de dicha aplicación informática.

Para el cálculo de los percentiles de nuestra población a estudio se aplicó la fórmula antes descrita incluyendo las variables del modelo final obtenido.

Tabla 7. Coeficientes obtenidos en el modelo.

<b>Mujer de 40 semanas feto hembra nulípara y española</b>		<b>Coeficiente no estandarizado</b>		
		<b>Coeficiente B</b>	<b>Error Estándar</b>	<b>p</b>
(Constante*)		3147.026	3.852	.000
Sexo RN varón		130.457	4.171	.000
Semanas de Gestación		136.128	1.762	.000
Paridad	Para 1	85.678	4.616	.000
	Para 2	115.365	7.992	.000
	Para 3 ó +	126.597	11.616	.000
Raza	Caucásica	104.445	7.027	.000
	Sudamericana	146.908	5.237	.000
	Árabe	143.135	12.815	.000
	Africana	54.843	24.932	.028
	Asiática	133.157	13.415	.000
	Otras	-40.001	28.913	.167

## Resultados

Tabla 8. Tabla de percentiles de peso FETAL para una mujer de origen español, gestante nulípara de 40 semanas con feto femenino: (peso 3233 gr y SD 11.29%) calculado con las fórmula de Hadlock et al y Mikolajczyk et al(123).

EG	Percentil								
	99	97	95	90	Mean	10	5	3	1
24	778	750	736	713	633	553	531	516	488
25	909	876	859	833	739	646	620	602	570
26	1054	1016	996	965	857	749	718	698	661
27	1213	1170	1147	1111	987	862	827	804	761
28	1387	1337	1311	1270	1128	986	945	919	870
29	1574	1518	1488	1442	1280	1119	1073	1043	987
30	1774	1710	1677	1625	1443	1261	1209	1176	1112
31	1985	1914	1877	1819	1615	1411	1353	1316	1245
32	2206	2127	2085	2021	1794	1568	1504	1462	1383
33	2434	2347	2301	2230	1980	1730	1659	1613	1526
34	2666	2571	2521	2443	2169	1895	1818	1767	1672
35	2900	2797	2742	2658	2360	2062	1977	1923	1819
36	3133	3021	2962	2871	2549	2227	2136	2077	1965
37	3360	3240	3177	3079	2734	2389	2291	2227	2107
38	3579	3451	3383	3279	2911	2544	2440	2372	2244
39	3784	3649	3578	3467	3079	2690	2580	2508	2373
40	3974	3832	3757	3641	3233	2825	2709	2634	2492
41	4143	3995	3917	3796	3371	2945	2824	2746	2598

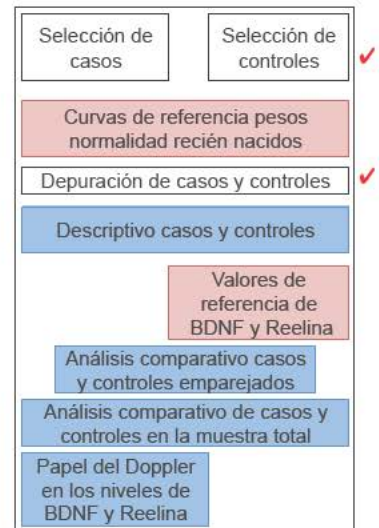
## **5.2. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES DE BRAIN DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR (BDNF) Y REELINA EN SANGRE DE CORDÓN ENTRE RECIÉN NACIDOS BAJO PESO PARA LA EDAD GESTACIONAL (BPEG) Y LOS QUE TIENEN PESO ADECUADO PARA SU EDAD GESTACIONAL (PAEG).**

### **5.2.1. ANALISIS DESCRIPTIVO DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO**

#### **a) Selección de casos y controles.**

Entre las gestantes atendidas en nuestro centro durante el periodo de estudio, se reclutaron en la unidad de ecografías 52 gestaciones diagnosticadas de fetos BPEG con los percentiles de Figueras et al (116) de las cuales una paciente fue perdida en el seguimiento.

Durante dicho periodo se reclutaron 95 gestaciones control tras el parto según los mismos percentiles de Figueras et al, descartando 2 pacientes que tras la revisión de la historia clínica correspondían a menos de 34 semanas.



## Resultados

### Aplicación de curvas de peso neonatal customizadas de nuestra población:

Tomando en consideración los percentiles customizados propios, tuvimos 4 casos catalogados como BPEG que fueron reclasificados como PAEG. Por otro lado, 4 controles fueron reclasificados como BPEG y no fueron tomados en consideración para sucesivos análisis principalmente por no disponer de estudio Doppler fetal.

Finalmente, nuestra muestra constó de 93 gestantes con diagnóstico de recién nacidos PAEG y 47 con BPEG.

La Figura 14 describe el diagrama de flujo de los sujetos que componen nuestra población a estudio, la aplicación de los percentiles y la recatalogación de los sujetos.

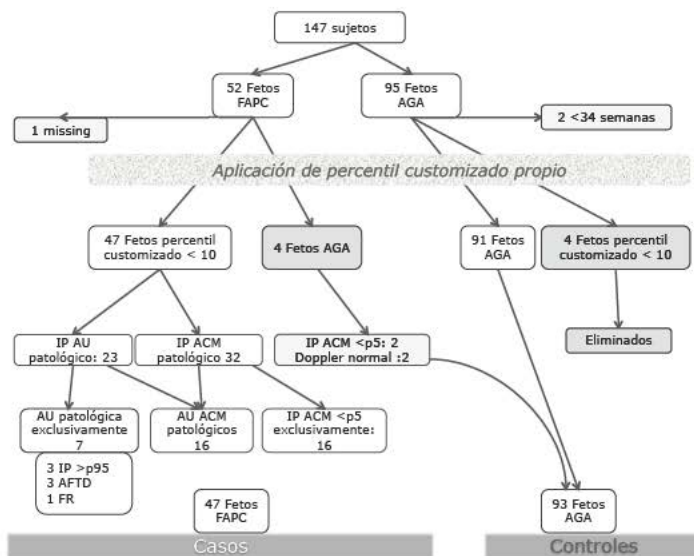
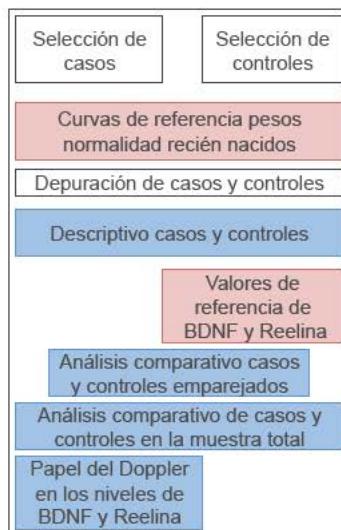


Figura 14. Diagrama de flujo de la selección de los sujetos a estudio y sus características.

## b) Análisis descriptivo individualizado de los casos y de los controles.

### b.1) FETOS BPEG

La muestra de gestantes con fetos diagnosticados de BPEG recogidos se compuso de 47 sujetos cuyas características se exponen en las Tablas 9.1-9.4.



## Resultados

Tabla 9.1-9.4 Características de la población BPEG.

<b>Tabla 9.1</b>		<b>RN BPEG N=47</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS MATERNAS</b>		<b>N(%) M(DT)</b>
<b>Edad materna</b> (años cumplidos)		32.4 ( $\pm$ 5.2)
<b>Paridad</b>		
	0	38 (80.9)
	1	11 (23.4)
	2	2 (4.3)
	3+	0
<b>Antecedentes Obstétricos</b>		
	Abortos $\geq$ 2	3 (6.4)
	Preeclampsia previa	1 (2)
	CIR previo	1 (2)
<b>Patología materna actual</b>		
	Diabetes	2 (4.3)
	Preeclampsia	14 (29.8)
	HTA	7 (14.9)
	Hipotiroidismo	5 (10.6)
<b>Fármacos</b>		
	Levotiroxina	5 (10.6)
	Insulina	1(2.1)
	Labetalol	7 (14.9)

<b>Tabla 9.2</b>	<b>RN BPEG N=47</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS OBSTETRICAS</b>	<b>N(%)</b>
<b>&gt; 12 horas de bolsa rota</b>	1 (2.1)
<b>Tratamiento con SO4Mg</b>	11 (23.4)
<b>Tipo de Parto</b>	
Eutócico	9 (19.1)
Instrumental	2 (4.3)
Cesárea sin trabajo de parto	22 (46.8)
Cesárea en trabajo de parto	14 (29.8)

De los 7 casos de hemorragia intraventricular diagnosticados durante el ingreso en la UCI neonatal, tan solo un caso tuvo una hemorragia grado IV, se trató de un recién nacido mujer de 27 semanas de gestación, que pesó 590 gramos y que falleció a los 22 días de vida.

<b>Tabla 9.3</b>		<b>RN BPEG N=47</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS NEONATALES</b>		<b>N(%) M(DT)</b>
<b>Edad gestacional</b> (semanas cumplidas)		34.6 (±3.3)
<b>Sexo</b>		
Varón		34 (72.3)
Mujer		17 (36.2)
<b>Peso RN (g)</b>		1771 (±534)
<b>Maduración pulmonar</b>		
	<34 semanas y realizada	19 (90.5)
	<34 semanas y no realizada	2 (9.5)
<b>Apgar &lt;7 al minuto</b>		6 (12.8)
<b>Apgar &lt;7 a los 5 minutos</b>		1 (2.1)
<b>pH arterial</b>		7.26 (±0.07)
<b>Reanimación Neonatal</b>		
	0	16 (34.0)
	I	5(10.6)
	II	12 (25.5)
	III	12 (25.5)
	IV	4 (8.5)
<b>Ingreso en UCI</b>		30 (63.8)
<b>Hemorragia Intraventricular</b>		7 (18.9)
	I	6
	II	0
	III	0
	IV	1

<b>Tabla 9.4</b>	<b>RN BPEG N=44</b>
<b>CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA VENA UMBILICAL</b>	<b>M(±DT)</b>
Hemoglobina (gr/dl)	17 (1.86)
Hematocrito (%)	51 (6)
Leucocitos( $10^3/\mu\text{L}$ )	13677 (10890)
Neutrófilos (%)	38.7 (14.3)
Linfocitos(%)	52.46 (16.35)
Monocitos (%)	5.98 (3.13)
BDNF (pg/mL)	5078 (2831)
Reelina total	16222 (10234)

La Tabla 10 describe las variables ecográficas fetales en los fetos con BPEG.

Tabla 10. Características hemodinámicas de la población BPEG.

<b>Tabla 10</b>	<b>RN BPEG N=47</b>
<b>VARIABLES HEMODINÁMICAS FETALES</b>	<b>N(%) M(DT)</b>
<b>Edad gestacional al diagnóstico</b> (semanas cumplidas)	33.2 (±3.7)
<b>BPEG precoz</b> (Diagnóstico <32 semanas)	13 (27.7%)
<b>IP AU patológica (&gt;p95)</b>	23 (48.9%)
Ausencia diástole	9
Flujo reverso	4
<b>IP ACM patológica (&lt;p5)</b>	32 (68.1%)
<b>IP AU y ACM patológicas</b>	16 (34.0%)
<b>IP DV patológico (&lt;p95)</b>	6 (12.7%)

**b.2) FETOS PAEG**

Del conjunto de los 93 fetos PAEG que finalmente analizamos, en las Tablas 11.1-11.4 se muestran las variables detalladas previamente, en el apartado de métodos.

Tablas 11.1-11.4 Características de la población PAEG.

<b>Tabla 11.1</b>		<b>RN PAEG N=93</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS MATERNAS</b>		<b>N(%) M(DT)</b>
<b>Edad materna</b> (años cumplidos)		31 ( $\pm$ 5.44)
<b>Paridad</b>		
	0	52 (55.9)
	1	23 (24.7)
	2	12 (12.9)
	3+	3 (3.2)
<b>Antecedentes Obstétricos</b>		
	Abortos $\geq$ 2	2 (2.2)
	Preeclampsia previa	0
	CIR previo	0
<b>Patología materna actual</b>		
	Diabetes	2 (2.2)
	Preeclampsia	0
	HTA	1(1.1)
	Hipotiroidismo	2 (2.2)
<b>Fármacos</b>		
	Levotiroxina	1 (1.1)
	Insulina	1 (1.1)
	Labetalol	0

<b>Tabla 11.2</b>	<b>RN PAEG N=93</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS OBSTÉTRICAS</b>	<b>M(DT)</b>
<b>&gt; 12 horas de bolsa rota</b>	13 (14)
<b>Maduración pulmonar</b>	2 (2.2)
<b>Tratamiento con SO4Mg</b>	0
<b>Tipo de parto</b>	
Eutócico	53 (56.9)
Instrumental	29 (31.2)
Cesárea sin trabajo de parto	8 (8.6)
Cesárea en trabajo de parto	3 (3.2)

La población de referencia de nuestro hospital utilizada en el apartado A para el cálculo de curvas de normalidad de peso neonatal customizadas, se usó para comparar las diferencias con la población de fetos PAEG.

## Resultados

<b>Tabla 11.3</b>		<b>RN PAEG N=93</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS NEONATALES</b>		<b>N(%) M(DT)</b>
<b>Edad gestacional</b> (semanas cumplidas)		38.23 ( $\pm$ 2.05)
<b>Sexo</b>		
Varón		43 (46.2)
Mujer		50 (53.8)
<b>Peso RN (g)</b> M(SD)		3231 ( $\pm$ 494)
<b>Apgar &lt;7 al minuto</b>		5 (5.4)
<b>Apgar &lt;7 a los 5 minutos</b>		0
<b>pH arterial</b>		7.28 ( $\pm$ 0.08)
<b>Reanimación Neonatal</b>		
	0	62 (66.7)
	I	21 (22.6)
	II	5 (5.4)
	III	2 (2.2)
	IV	2(2.2)
<b>Ingreso en UCI</b>		6(6.5)
<b>Hemorragia Intraventricular</b>		0

<b>Tabla 11.4</b>	<b>RN PAEG N=89</b>
<b>VARIABLES BIOQUÍMICAS DE LA VENA UMBILICAL</b>	<b>M(±DT)</b>
Hemoglobina (gr/dl)	15.67 (1.3)
Hematocrito (%)	46.37(3.9)
Leucocitos( $10^3/\mu\text{L}$ )	15733 (5594)
Neutrófilos (%)	51.99 (12.4)
Linfocitos(%)	35.64 (12.5)
Monocitos (%)	8.11 (8.3)
BDNF (pg/mL) (n:93)	7220 (3034)
Reelina total (n;17)	16551 (8815)

En la Tabla 12 se muestran los valores de cada una de las variables disponibles y su significación estadística.

Tabla 12. Comparativa entre la población de referencia de nuestro hospital y la población a estudio control. N(%) M(DT).

<b>Tabla 12</b>	<b>Población referencia</b>	<b>Fetos PAEG</b>	
	<b>2005-2011</b>	<b>(DT , %)</b>	<b>p</b>
<b>Edad materna</b>	31 (±5.44)	31 (±5.68)	<0.01
<b>Primiparidad</b>	27785/49859 (55.7)	52/93 (57)	0.97
<b>Cesárea</b>	10546/49969 (21.1)	11/93 (11.8)	0.04
<b>Preeclampsia</b>	848/49969 (1.7)	0/93 (0)	0.39
<b>Diabetes</b>	372/49969 (0.8)	2/93 2.2)	0.33
<b>RN varón</b>	22619/43709 (51.8)	43 (46.2)	0.34

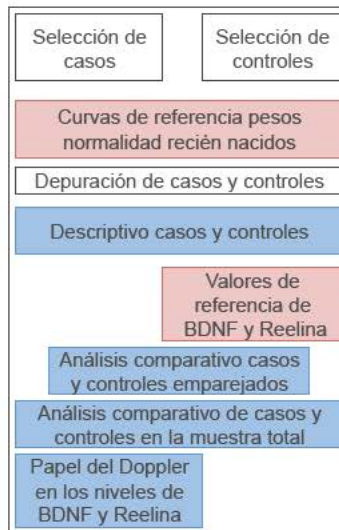
## Resultados

La descripción del análisis de las moléculas a estudio, se exponen de forma separada para el BDNF y para la Reelina, aun siguiendo la misma metodología.

## 5.2.2 DETERMINACIÓN DE LOS VALORES DE REFERENCIA DE BDNF Y REELINA EN FETOS PAEG.

### a) Valores de referencia del BDNF en sangre de cordón de los fetos PAEG.

Para la elaboración de los valores de referencia de BDNF en los fetos PAEG se siguió la metodología de Royston y Wright tal y como se explica en el apartado 4.2.1.



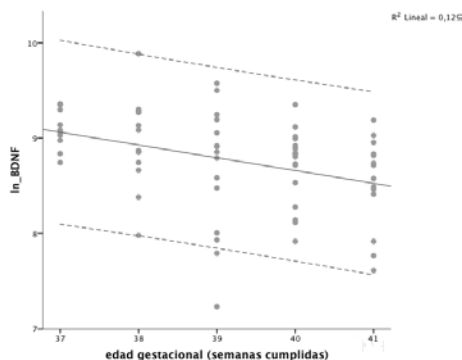
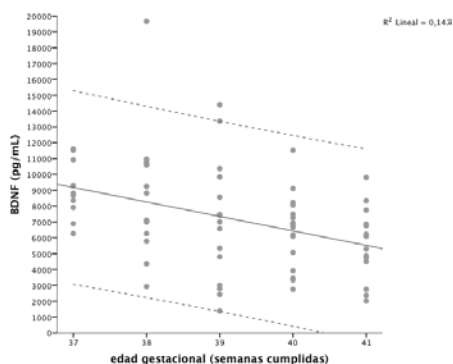
Para conocer la distribución Gaussiana de los datos, observamos que la distribución de los Z-Score del BDNF seguían una distribución normal por el test de Shaphiro-W (Tabla 13).

## Resultados

Tabla 13. Distribución del Z-score del BDNF de nuestra población control.

Tabla 13	Edad Gestacional	Shapiro-Wilk	
	(semanas cumplidas)	df	p
Zscore BDNF	37	10	0.528
	38	14	0.054
	39	15	0.647
	40	17	0.562
	41	14	0.902

Tras evaluar el ajuste de la distribución de los datos por regresión lineal, logarítmica, cúbica y cuadrática, encontramos significativo sólo el modelo de estimación lineal y logarítmica ( $p < 0.01$ ). Ambas quedan reflejadas en las Figuras 15 representándose su media y sus intervalos de confianza para el 95% de los datos muestrales pero por razones prácticas vamos a plasmar la fórmula de los datos mediante la regresión lineal.



Figuras 15. Relación entre el BDNF y la edad gestacional en fetos a término y sanos.

$$\text{Valor medio BDNF (pg/mL)} = 42953 - 913 \times \text{edad gestacional (semanas cumplidas)};$$
$$R^2 = 0.15; p < 0.001$$

Considerando la totalidad de la muestra de  $\geq 37$  semanas, obtuvimos una media de BDNF de 7201 pg/mL con 70 fetos analizados de media 39 semanas.

## Resultados

### **Análisis de la relación de los valores del BDNF en función del sexo del recién nacido.**

Los recién nacidos de sexo femenino tenían valores de BDNF superiores a los de sexo masculino, con una diferencia entre ambas medias de 1130 pg/mL, no significativa ( $p=0.144$ ) (Figura 16).

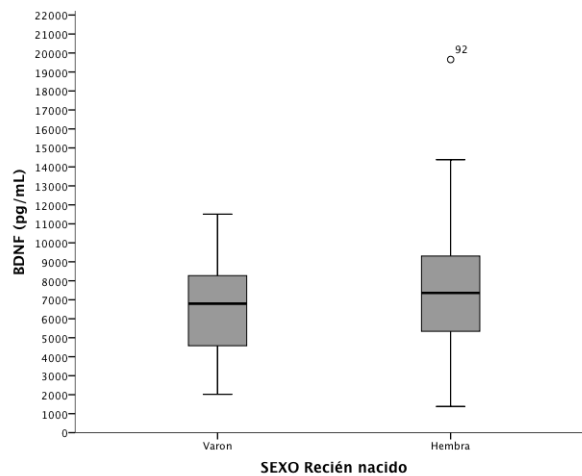


Figura 16. Relación del BDNF y sexo del RN en sujetos sanos y a término.

### Análisis de la relación de los valores del BDNF en función de las horas de bolsa rota.

Del mismo modo, se evaluó la influencia de las horas de bolsa rota, observando que los recién nacidos con más de 12 horas tenían 2985 pg/mL más de BDNF de media que los que tuvieron menos de 12 horas ( $p < 0.05$ ) (Figura 17).

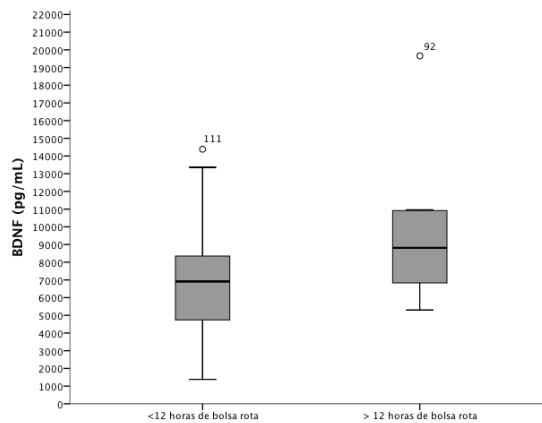


Figura 17. Relación del BDNF con las horas de bolsa rota al nacimiento.

## Resultados

### **Análisis de la relación de los valores del BDNF por edad gestacional, ajustados por sexo del recién nacido y horas de bolsa rota.**

La relación de los niveles de BDNF para la edad gestacional ajustada por sexo fetal se refleja en la Figura 18. Puede observarse que los niveles de BDNF de recién nacidos con sexo femenino son superiores a los de recién nacidos con sexo masculino. Sin embargo, dicho ajuste no resultó significativo ni relevante en cuanto al cambio de coeficiente beta asociado a la edad gestacional (Coeficiente beta de 913 pg/mL frente a 905 y  $p=0.133$ ) (Tabla 14).

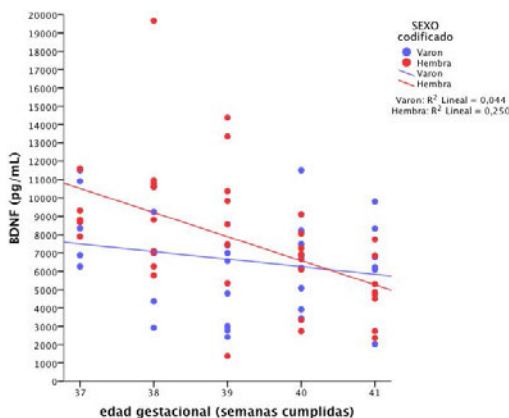


Figura 18. Relación del BDNF y la edad gestacional en fetos a término y sanos, ajustada para el sexo del RN.

Tabla 14. Regresión lineal de la relación entre el BDNF y la edad gestacional y sexo del RN.

Tabla 14	Coeficiente B no estandarizado	p	95% Intervalo de confianza	
			Límite Inferior	Límite Superior
<b>Edad gestacional (SG)</b>	-904.6	0.001	-1432.7	-376.6
<b>Sexo RN (mujer)</b>	1079.87	0.133	-338.1	2497.87

De la misma forma, se estudio los niveles de BDNF de dichos fetos PAEG en función de la edad gestacional y las horas de bolsa rota recogidas como mayor o menor de 12 horas de duración, observando que dicha variable influenciaba en los niveles de BDNF al nacimiento.

En la Tabla 15 se evidencian con regresión lineal, dichas relaciones.

## Resultados

Tabla 15. Regresión lineal de la relación entre el BDNF y la edad gestacional y la rotura de bolsa amniótica de mas de 12 horas.

<b>Tabla 15.</b> <b>Fetos PAEG a término</b>	<b>Coefficiente B no estandarizado</b>	<b>p</b>
<b>Edad gestacional (SG)</b>	-932	0.001
<b>Más de 12 Horas de Bolsa Rota</b>	2718	0.010

## b) Valores de referencia de Reelina en fetos PAEG.

Por razones técnicas (la necesidad de crear nuestro propio gel de Wester-Blot y la optimización de los recursos disponibles) las muestras de Reelina analizadas fueron menores. En total obtuvimos 34 sujetos, 17 fetos BPEG y 17 fetos PAEG. De los 17 fetos con crecimiento adecuado para la edad gestacional, 12 eran a término cuya distribución de los niveles de Reelina por edad gestacional se ve representado en la siguiente gráfica (Figura 19). Como puede observarse el número resulta insuficiente para poder realizar un análisis específico de normalidad tal y como propone Royston & Wright en el apartado de métodos.

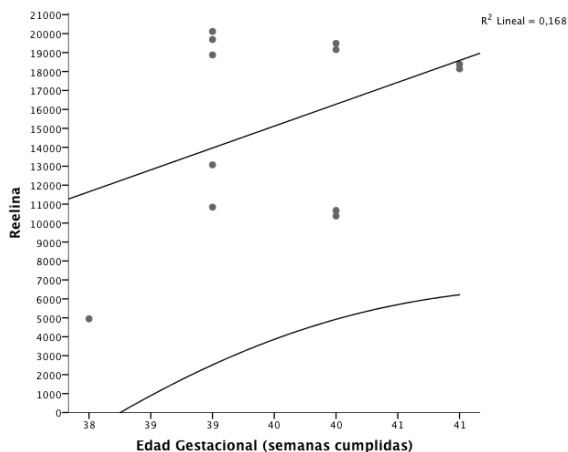


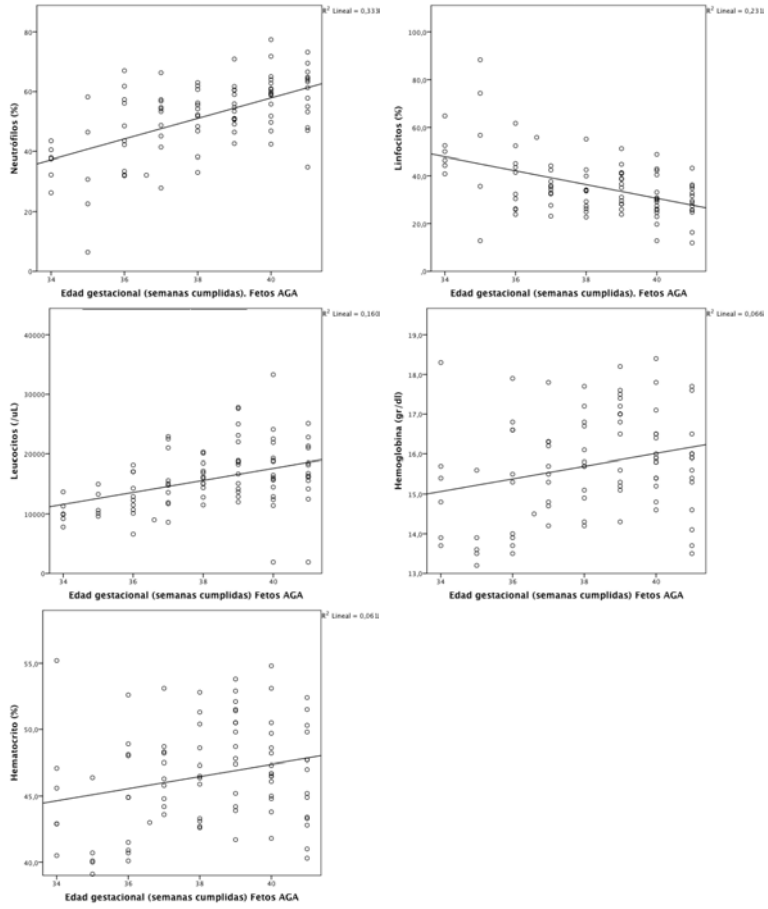
Figura 19. Relación de la Reelina con la edad gestacional.

**Análisis de la relación de los valores del Reelina por otras variables.**

De la misma forma, en la población a término con crecimiento PAEG, no pudo analizarse la relación con el sexo del recién nacido ni con la presencia de más de 12 horas de bolsa rota tal y como se hizo con el BDNF.

**Análisis de calidad de la muestra en sangre de cordón en fresco.**

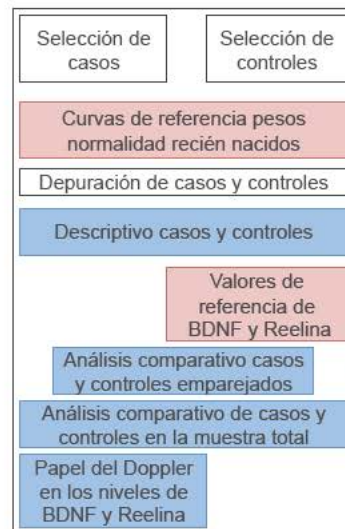
En las figuras 20.1-20.5 a modo de control de calidad, tal y como se relata en el apartado de material y métodos, se describe la distribución de las diversas variables analizadas en el hemograma de sangre del cordón en función de la edad gestacional de los recién nacidos PAEG. Todas estas variables analizadas mostraron una tendencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) de forma directa para la hemoglobina, hematocrito, leucocitos y neutrófilos, y de forma indirecta para los linfocitos.



Figuras 20.1-20.5 Distribución de las variables hematológicas de sangre venosa en cordón umbilical al nacimiento en relación a la edad gestacional.

### 5.2.3. ANALISIS COMPARATIVO DE CASOS Y CONTROLES EMPAREJADOS.

El emparejamiento de los casos y controles para el estudio del BDNF se realizó en un ratio de 1:1, considerando el control que más datos aportase para el análisis comparativo siempre emparejados por edad gestacional mayor de 34 semanas y sexo; por lo que nos quedó una población caso-control de 36 parejas, que se detalla en la tabla 1.



En la Figura 21 se exponen la proporción de sujetos emparejados de la muestra total analizada.

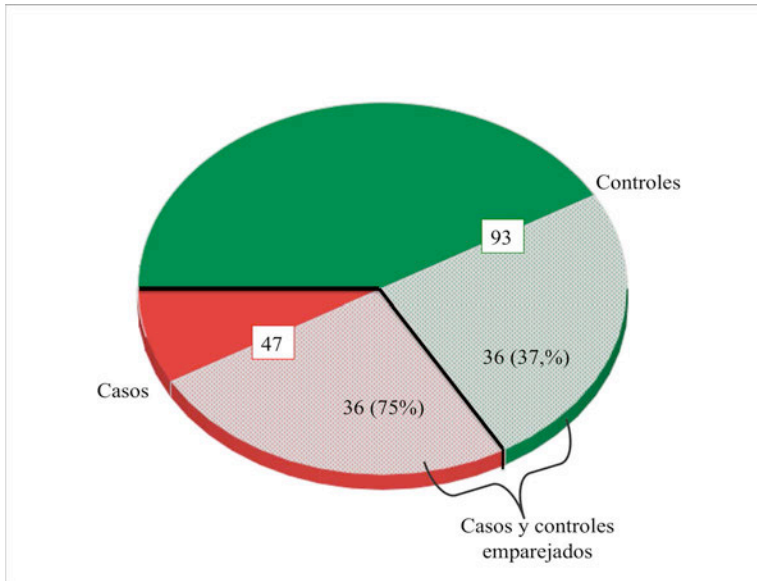


Figura 21. Proporción de sujetos emparejados sobre el total de la muestra reclutada.

En las Tablas 16, 17, 18 y 19 se exponen la media o el porcentaje de cada variable analizada entre los grupos, así como el estadístico de significación tras el análisis comparativo univariante.

## Resultados

Tabla 16 Análisis comparativo entre casos y controles emparejados. Variables clínicas materna.

<b>Tabla 16</b>	<b>CASOS BPEG</b>	<b>CONTROLES</b>	<b>p</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS MATERNAS</b>	<b>N=36</b>	<b>PAEG N=36</b>	
	<b>N(%) M(DT)</b>	<b>N(%) M(DT)</b>	
<b>Edad Materna</b> (años cumplidos)	32.1 (5.2)	30.8 (5.5)	0.44
<b>Paridad</b>			<b>&lt;0.01</b>
0 (46)	29 (80.6)	17 (50.0)	
1 (17)	6 (16.7)	11 (31.4)	
2 (4)	1 (2.8)	3 (8.8)	
3+ (3)	0	3 (8.6)	
<b>Antecedentes Obstétricos</b>			
Abortos $\geq 2$	1 (2.9)	2 (5.7)	0.51
Preeclampsia previa	0	0	-
CIR previo	0	0	-
<b>Patología materna Actual</b>			
Diabetes	2 (5.6)	0	0.32
Preeclampsia	6 (16.7)	0	<b>0.02</b>
HTA	4 (11.1)	0	0.10
Hipotiroidismo	4 (12.1)	1 (3.1)	0.19
<b>Fármacos (algunos de ellos)</b>			<b>0.03</b>
Levotiroxina	4 (10.8)	0	
Insulina	1 (2.7)	0	
Labetalol	4 (10.8)	0	

Tabla 17. Análisis comparativo entre casos y controles emparejados. Variables clínicas obstétricas.

<b>Tabla 17</b>			
<b>VARIABLES CLÍNICAS OBSTÉTRICAS</b>	<b>CASOS BPEG N=36 N(%) M(DT)</b>	<b>CONTROLES PAEG N=36 N(%) M(DT)</b>	<b>P</b>
<b>&gt;12 horas de Bolsa rota</b>	1 (3.2)	7 (20)	<b>0.04</b>
<b>Maduración Pulmonar</b>			0.83
<b>No realizada</b>	1 (10)	0	
<b>Realizada</b>	9 (90)	2 (100)	
<b>Tratamiento con SO4Mg</b>	4 (11.1)	0	0.06
<b>Tipo de Parto</b>			<b>&lt;0.01</b>
Eutócico	9 (25.0)	24 (67.6)	
Instrumental	3 (8.3)	9 (24.3)	
Cesárea sin trabajo de parto	16 (44.4)	2 (5.4)	
Cesárea en trabajo de parto	8 (22.2)	1 (2.8)	

## Resultados

Tabla 18 Análisis comparativo entre casos y controles emparejados. Variables clínicas neonatales.

<b>Tabla 18</b>		<b>CASOS</b>		<b>CONTROLES</b>		<b>p</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS</b>		<b>BPEG N=36</b>		<b>PAEG N=36</b>		
<b>NEONATALES</b>		<b>N(%) M(DT)</b>		<b>N(%) M(DT)</b>		
<b>Edad gestacional (SG)</b>		36 (2)		36 (2)		0.99
<b>Sexo</b>	Varón	23 (63.9)		23 (63.9)		0.60
	Mujer	13 (36.1)		13 (36.1)		
<b>Peso RN (g)</b>		1996 (382)		2968 (509)		<b>&lt;0.01</b>
<b>Percentil Customizado</b>		2 (3)		59 (31)		<b>&lt;0.01</b>
<b>Perímetro Cefálico (cm)</b>		31 (1.9)		34 (1.6)		<b>&lt;0.01</b>
<b>Apgar &lt;7, al minuto</b>		1 (2.8)		0		0.50
<b>Apgar &lt;7, a los 5 min.</b>		0		0		-
<b>pH Arterial</b>		7.27 (0.07)		7.29 (0.09)		0.10
<b>Reanimación Neonatal</b>	0	16 (47.1)		24 (66.7)		<b>&lt;0.01</b>
	I	3 (8.8)		10 (27.8)		
	II	7 (20.6)		2 (5.6)		
	III	8 (23.5)		0		
<b>Ingreso en UCI</b>		17 (47.2)		3 (8.3)		<b>&lt;0.01</b>
<b>Complicaciones Neonatología</b>						
	Ninguna	31(86.1)		31 (86.1)		
	Sepsis	1 (2.8)		0		0.75
	SDR	2 (5.6)		2 (5.6)		
	Otros	2 (5.6)		3 (8.3)		
<b>Hemorragia Intraventricular</b>		3 (8.6)		1 (2.8)		0.30

Tabla 19. Análisis comparativo entre casos y controles emparejados. Variables bioquímicas de vena umbilical.

<b>Tabla 19</b>			
<b>CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA VENA UMBILICAL</b>	<b>CASOS BPEG N=36 M(DT)</b>	<b>CONTROLES PAEG N=36 M(DT)</b>	<b>p</b>
Hemoglobina (gr/dl)	17.0 (1.9)	15.4 (1.5)	<b>0.01</b>
Hematocrito (%)	51 (6)	45 (4)	<b>&lt;0.01</b>
Leucocitos(por mm <sup>3</sup> )	14730 (11842)	12645 (3952)	0.33
Neutrófilos (%)	43 (11)	45 (14)	0.56
Linfocitos(%)	47 (12)	40 (16)	0.07
Monocitos (%)	6 (3)	8 (2)	<b>0.03</b>
BDNF (pg/mL)	5744 (2604)	6782 (2538)	0.09
Reelina (ver apartado 5.2.4.b)	No determinado	No determinado	-

La descripción del Doppler en RN BPEG que se analizaron en este estudio caso-control se muestra en la Tabla 20.

Tabla 20. Distribución de la alteración Doppler en los RN con BPEG (casos).

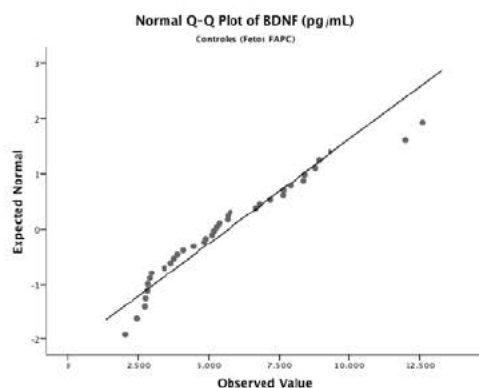
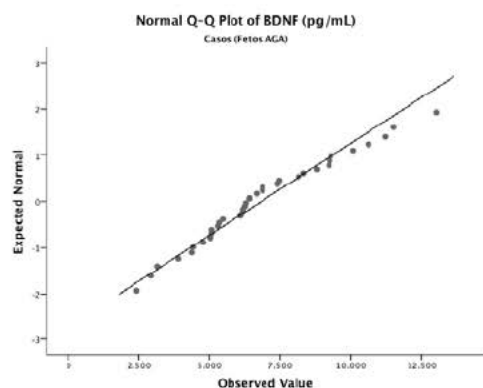
<b>Tabla 20.</b>	<b>N (%)</b>
BPEG Doppler normal	9 (25)
ACM IP <p5	15 (41.7)
AU y ACM patológicas	8 (22.2)
AU IP > p95	12 (33.6)

## Resultados

Para valorar la diferencia de los niveles de BDNF entre los grupos de estudio, se evaluó el tipo de distribución de la variable obteniendo la Tabla 21 y los gráficos de normalidad (Figuras 22.1-22.2).

Tabla 21. Estadísticos de normalidad de la distribución del BDNF

Tabla 21	Grupo de estudio	Kolmogorov-Smirnov		Shapiro-Wilk	
		Valor	p	Valor	p
<b>BDNF (pg/mL)</b>	CASOS (PAEG)	0.131	0.124	0.968	0.38
	CONTROLES (BPEG)	0.129	0.140	0.932	<b>0.03</b>



Figuras 22. Gráficos de normalidad de la distribución del BDNF

Para la comparación de BDNF, se utilizó la prueba de comparación de medianas y U de Mann-Whitney ya que la distribución del BDNF no era normal en los fetos BPEG por la prueba de Shapiro-Wilk.

Se observó que la concentración de BDNF fue inferior en los fetos FACP comparado con los PAEG pero dicha diferencia caso-control no fue estadísticamente significativa, con un estadístico de 0.073 (Tabla 22 y Figura 23).

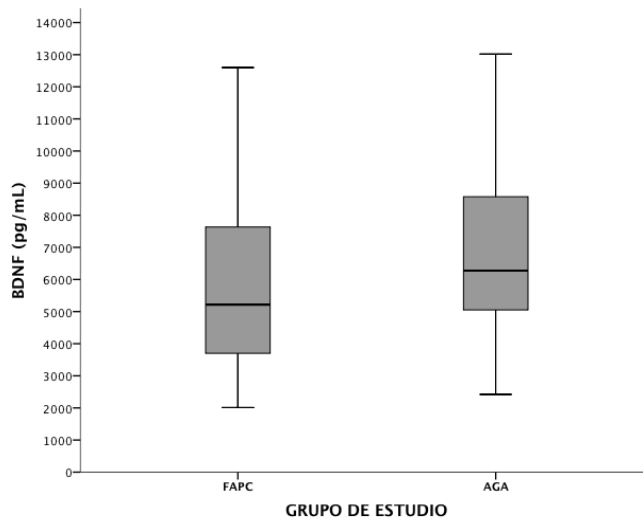


Figura 23. Relación de los niveles de BDNF en función del grupo de estudio emparejado (AGA-caso o BPEG-control)

## Resultados

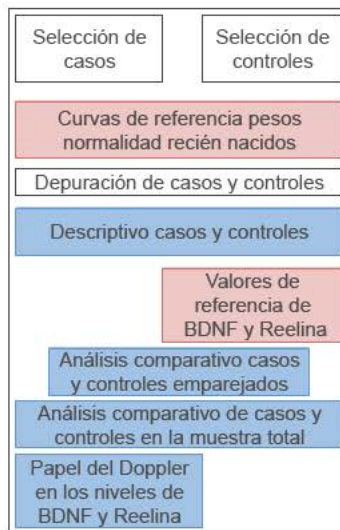
Tabla 22. Estadístico no paramétrico de la relación entre el BDNF y el grupo de estudio

<b>Tabla 22</b>	<b>BDNF (pg/mL)</b>
Mann-Whitney U	489
Wilcoxon W	1155
Z	-1.791
Asymp. Sig. (2-tailed)	.073

#### 5.2.4. Determinación de BDNF y Reelina en relación a las variables de estudio en el total de la muestra.

##### A) DETERMINACIÓN DEL BDNF EN RELACIÓN A LAS VARIABLES DE ESTUDIO EN EL TOTAL DE LA MUESTRA.

Para evaluar la influencia de las variables recogidas sobre el BDNF en el total de la muestra, se realizó un análisis univariante. En las Tablas 23.1-23.4 se recoge la relación.



## Resultados

Tabla 23.1. Análisis univariante de los niveles de BDNF en función de las variables clínicas materna sobre el total de la muestra reclutada.

<b>Tabla 23.1.</b> <b>VARIABLES CLÍNICAS MATERNAS</b>	<b>BDNF (pg/mL)</b> <b>M(DT)</b>	<b>P</b>
<b>Edad materna</b> (años cumplidos)		0.366
<b>Nuliparidad</b>		0.252
	No 6130 (2872)	
	Si 6750 (3212)	
<b>Antecedentes Obstétricos</b> (>2 abortos, CIR o preeclampsia previa)		<b>0.044</b>
	No 6528 (2840)	
	Si 4279 (3292)	
<b>Patología Materna Actual</b> (preeclampsia, diabetes, Hipotiroridismo o HTA)		<b>0.022</b>
	No 6813 (3033)	
	Si 4876 (3209)	
<b>Hipotiroidismo</b>		<b>0.045</b>
	No 6724 (3100)	
	Sí 4318 (2201)	
<b>Fármacos</b> (alguno de ellos)		
Si (Levotiroxina, insulina, labetalol)	6739 (3053)	<b>0.032</b>
No	5276 (2879)	

Tabla 23.2. Análisis univariante de los niveles de BDNF en función de las variables clínicas obstétricas sobre el total de la muestra reclutada.

<b>VARIABLES CLÍNICAS OBSTÉTRICAS</b>		<b>BDNF (pg/mdL) M (DT)</b>	<b>p</b>
<b>&gt; 12 Horas de bolsa rota</b>			
	Si	8833 (3433)	<b>0.001</b>
	No	6168 (2954)	
<b>Tratamiento con SO4Mg</b>			
	No	6695.30 (3025.189)	<b>0.006</b>
	Sí	4090.49 (2572.29)	
<b>Tipo de parto</b>			<b>0.003</b>
	Vaginal	6927 (2949)	
	Cesárea	5193 (3123)	

## Resultados

Tabla 23.3. Análisis univariante de los niveles de BDNF en función de las variables clínicas neonatales sobre el total de la muestra reclutada.

<b>Tabla 23.3. VARIABLES CLÍNICAS NEONATALES</b>		<b>BDNF (pg/mL) M (DT)</b>	<b>P</b>
<b>Edad Gestacional (SG)</b>		266 (112-420)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Sexo</b>	Varón	5710 (2690)	<b>&lt;0.001</b>
	Mujer	7406 (3253)	
<b>Peso RN (g)</b>		1 (0.4-1.5)	<b>&lt;0.001</b>
<b>Feto PAEG (Controles)</b>		7141 (2999)	<b>&lt;0.0001</b>
	<b>BPEG (Casos)</b>	5111 (2819)	
<b>Maduración pulmonar</b>	Sí	4270 (2798)	0.1
	No realizada	1148 (1225)	
<b>Apgar &lt;7 al minuto</b>		4770 (3503)	0.052
	<b>&lt;7 a los 5 min.</b>	1731 (Caso único)	
<b>pH arterial</b>		-3405 (-9759-2948)	0.291
<b>Reanimación Neonatal</b>			<b>0.001</b>
	<= I	7025 (2954)	
	>=II	5164 (3031)	
<b>Ingreso en UCI</b>	No	7122 (2975)	<b>&lt;0.0001</b>
	Si	4583 (2517)	
<b>Hemorragia intraventricular</b>	No	6627 (3054)	0.075
	Si	4522 (2578)	

Tabla 23.4. Análisis univariante de los niveles de BDNF en función de las variables bioquímicas de la vena umbilical sobre el total de la muestra reclutada.

<b>CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE VENA UMBILICAL (n=136)</b>	<b>Coefficiente b no estandarizado</b>	<b>Limite inferior</b>	<b>Limite superior</b>	<b>p</b>
Hemoglobina (gr/dl)	-190.6	-506	125	0.235
Hematocrito (%)	-83.1	-180	14	0.093
Leucocitos (por mm <sup>3</sup> )	0.1	0	0.1	0.027
Neutrófilos	34.2	-1.4	69.8	0.059
Linfocitos	-31.9	-64	0.4	0.053
Monocitos	-27.2	-101	47	0.470

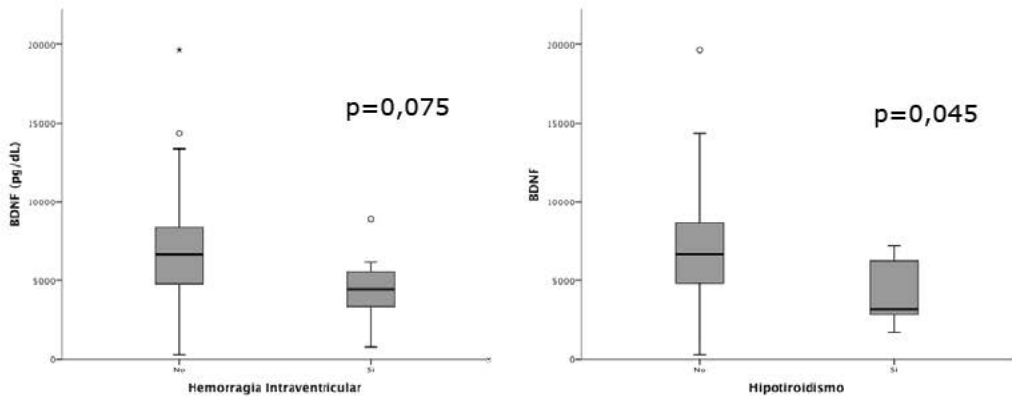


Figura 24.1-24.2. Relación de los niveles de BDNF y la presencia de Hipotiroidismo materno, hemorragia intraventricular del RN

## Resultados

En la Figuras 24.1-24.2 se muestran los valores de BDNF en los casos con hipotiroidismo materno y hemorragia intraventricular del RN.

Analizadas las relaciones univariantes, se recogieron las variables que influían en los niveles de BDNF con una significación de  $p < 0.2$ . El modelo máximo resultante se detalla en la Tabla 24.

A partir de este modelo, se creó el modelo óptimo por el método paso hacia atrás y con la inclusión de las variables edad gestacional, peso y sexo del recién nacido por el principio jerárquico de regresión. La Tabla 25 expone el modelo final.

Tabla 24. Modelo máximo resultante mediante regresión lineal del nivel de BDNF en función de las variables clínicas recogidas del total de la muestra analizada.

<b>Tabla 24.</b>	<b>Coefficiente B</b>	<b>Limite inferior</b>	<b>Límite superior</b>	<b>p</b>
Antecedentes Obstétricos (>2 abortos, CIR o preeclampsia previa)	-895	-3619	1997	0.525
Patología Materna Actual (preeclampsia, diabetes o HTA)	-757	-2841	1365	0.482
Hipotiroidismo	596	-3204	4397	0.756
Fármacos (alguno)	-300	-2142	1464	0.743
Más de 12 horas RPM	1619	110	3129	<b>0.037</b>
Tratamiento SO4Mg	-215	-3172	2752	0.886
Cesárea	206	-1202	1629	0.774
Edad gestacional (SG)	12	-304	345	0.944
Sexo	1800	742	2902	<b>0.001</b>
Peso RN	-0.445	-1.855	0.951	0.531
Feto AGA	561	-1496	2602	0.589
Apgar <7 al min.	-560	-2847	1480	0.608
REA (>=II)	238	-440	767	0.774
Ingreso en UCIN	-2318	-4155	-625	<b>0.011</b>
Hematocrito (%)	10	-106	126	0.864
Leucocitos	0.068	.001	0.134	<b>0.044</b>
Neutrófilos	17	-76	107	0.706
Linfocitos	47	-37	127	0.254

## Resultados

Tabla 25. Modelo óptimo resultante mediante regresión lineal del nivel de BDNF en función de las variables clínicas recogidas del total de la muestra.

<b>Tabla 25.</b>	<b>Coefficiente B</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>	<b>p</b>
<b>Más de 12 horas de bolsa rota</b>	2094	628	3560	<b>0.006</b>
<b>Edad gestacional</b> (semanas cumplidas)	107	-175	389	0.454
<b>Sexo</b>	2028	1047	3008	<b>0.000</b>
<b>Peso RN (g)</b>	-0.579	-2.0	0.8	0.410
<b>Feto AGA</b>	886	-984	2757	0.350
<b>Ingreso en UCIN</b>	-2367	-3887	-848	<b>0.003</b>
<b>Leucocitos</b>	0.069	0.004	.0134	<b>0.038</b>
<b>Linfocitos</b>	34.4	-6.5	75.4	0.099

## B) DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE REELINA EN FUNCIÓN DE LAS VARIABLES A ESTUDIO EN EL TOTAL DE LA MUESTRA.

Tabla 26.1. Análisis descriptivo del total de muestra analizada de Reelina. Variables clínicas maternas.

<b>Tabla 26.1</b>	<b>Reelina Total M</b>	<b>p</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS MATERNAS</b>	<b>(DT)</b>	
<b>Edad materna</b>	-251 (-928 426)	0.456
<b>Nuliparidad</b>		0.189
	No 13318 (6459)	
	Sí 17868(10273)	
<b>Antecedentes Obstétricos (&lt;2 abortos, CIR o preeclampsia previa)</b>		0.142
	No 16810 (9188)	
	Si 2758 (único)	
<b>Patología materna actual</b> (preeclampsia, diabetes, HTA o Hipotiroidismo)		0.254
	No 17394 (9308)	
	Si 10968 (6167)	
<b>Fármacos</b> (alguno de ellos: Levotiroxina, insulina, labetalol)		0.844
	No 16247 (8944)	
	Si 17092 (12079)	

## Resultados

En las Tablas 26.1-26-4 se muestra el análisis descriptivo de la Reelina en función de las variables analizadas en un análisis univariante.

No se encontró ninguna relación significativa entre la concentración de Reelina y las variables incluidas en el estudio.

Tabla 26.2 Análisis descriptivo del total de muestra analizada de Reelina. Variables clínicas obstétricas.

<b>Tabla 26.2.</b>	<b>Reelina Total</b>		<b>p*</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS OBSTÉTRICAS</b>	<b>M (DT)</b>		
<b>Más de 12 horas de bolsa rota</b>			0.58
	No	17102 (10043)	
	Sí	14147 (6311)	
<b>Tratamiento SO4Mg</b>			0.94
	No (29)	16147(8946)	
	Sí (3)	16619(17911)	
<b>Tipo de parto</b>			0.43
	Vaginal	17288 (9077)	
	Cesárea	14532 (10117)	

Tabla 26.3. Análisis descriptivo del total de muestra analizada de Reelina. Variables clínicas neonatales.

<b>Tabla 26.3.</b>		<b>Reelina Total</b>	<b>p</b>
<b>VARIABLES CLÍNICAS NEONATALES</b>		<b>M (DT)</b>	
<b>(N)</b>			
<b>Edad gestacional</b>		0.18	0.309
<b>Sexo</b>	Varón (20)	15111(7554)	0.388
	Mujer (14)	17919(11491)	
<b>Peso RN (g) (34)</b>		-0.02	0.911
<b>Feto</b>	PAEG	14873 (5255)	0.351
	BPEG	17920 (12132)	
<b>Maduración Pulmonar</b>	Sí (8)	15645	0.728
	No realizada (1)	10889	
<b>pH Arterial (34)</b>		0.111	0.531
<b>Reanimación Neonatal (32)</b>			0.661
	0 (17)	16846(10625)	
	I (8)	16606(6002)	
	II (3)	9592(7782)	
	III (5)	16639(11965)	
	IV (0)	–	
<b>Ingreso en UCI</b>	No (25)	16776(9261)	0.592
	Si (10)	14880(9661)	
<b>Hemorragia Intraventricular</b>			0.088
	No(33)	16894(9116)	
	Si (2)	5356(3675)	

Tabla 26.4. Análisis descriptivo del total de muestra analizada de Reelina. Características bioquímicas de la vena umbilical.

<b>Tabla 26.4.</b>	<b>Coefficiente B</b>			<b>p</b>
	<b>no</b>	<b>Límite</b>	<b>Límite</b>	

## Resultados

<b>CARACTERÍSTICAS BIOQUÍMICAS DE LA VENA UMBILICAL (n=32)</b>	<b>estandarizado</b>	<b>inferior</b>	<b>superior</b>	
Hemoglobina (gr/dl)	649	-1238	2536	0.488
Hematocrito (%)	146	-477	769	0.636
Leucocitos(por mm <sup>3</sup> )	0.34	-0.31	0.98	0.293
Neutrófilos	113	-121	346	0.331
Linfocitos	-107	-318	103	0.307
Monocitos	56	-1052	1164	0.919

En la Figuras 25.1 y 25.2 se muestran los valores de Reelina en los casos con hipotiroidismo materno y hemorragia intraventricular del RN.

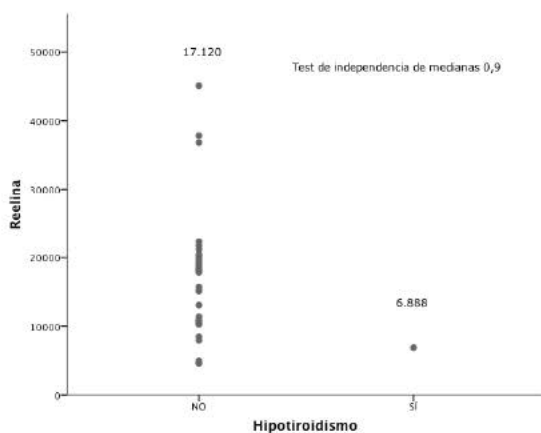


Figura 25.1 Relación entre el nivel de Reelina e Hipotiroidismo materno.

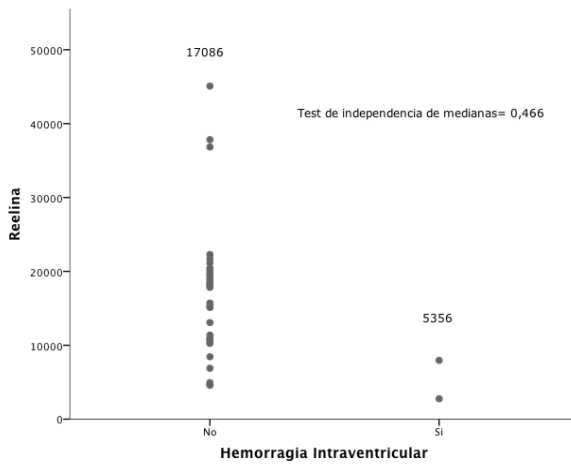


Figura 25.2 Relación entre el nivel de Reelina y Hemorragia Intraventricular del RN.

De la misma forma que en el análisis del BDNF, seleccionamos las variables más influyentes ( $p > 0.2$ ) y las analizamos de forma conjunta con regresión lineal incluyendo el peso del recién nacido y la edad gestacional por principio jerárquico al incluir la variable a estudio (feto PAEG o BPEG) resultando la Tabla 27.

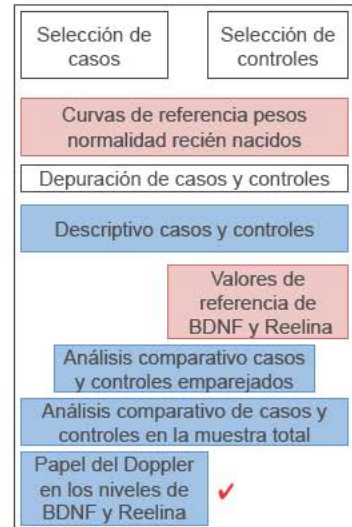
## Resultados

Tabla 27. Modelo máximo de la relación de la Reelina con las variables prenatales mediante regresión lineal.

Tabla 27.	Coeficiente B no estandarizado	95% Intervalo de confianza de B		p
		Límite inferior	Límite superior	
Edad Gestacional (SG)	1262	-1231	3754	0.307
Nuliparidad	44	-9559	9647	0.992
Patología Materna Actual	-8588	-22399	5222	0.212
Peso del RN (g)	-5	-17	8	0.453
Feto BPEG	3837	-9035	16709	0.544
Leucocitos (x mm <sup>3</sup> )	0.131	-0.576	0.838	0.705

### 5.2.5. Papel del Doppler en los niveles de BDNF y Reelina.

En el grupo de los fetos BPEG analizamos las variables ecográficas con el objetivo de evaluar las diferencias de BDNF en función del grado de afectación hemodinámica fetal. Para ello, se recogió la variable Doppler antenatal en una media de 3 días previos al parto (Tabla 28).



Se clasificó como una variable de tres categorías: Fetos PAEG, fetos BPEG con AU normal y ACM patológica y fetos BPEG con AU patológica (con ACM normal o patológica).

En la Figura 26 y Tabla 29 se muestran los valores de BDNF para los distintos grados de afectación en función de nuestra clasificación.

## Resultados

Tabla 28. Intervalo transcurrido entre la última ecografía y el parto.

<b>Tabla 28.</b> <b>Intervalo Eco-Parto</b>	<b>Días</b>
Media	3.2
Mediana	1
Mínimo	0
Máximo	19
Rango intercuartílico	3.5

Tabla 29. Niveles de BDNF en función de los distintos estadios de alteración del crecimiento.

<b>Tabla 29.</b>	<b>N</b>	<b>Media BDNF (pg/mL)</b>	<b>DT</b>
Fetos PAEG (AU normal y ACM normal)	91	7241	3035
Fetos BPEG con AU normal y ACM patológica	16	6585	2608
Fetos BPEG con AU patológica (con o sin ACM patológica)	23	4176	2853

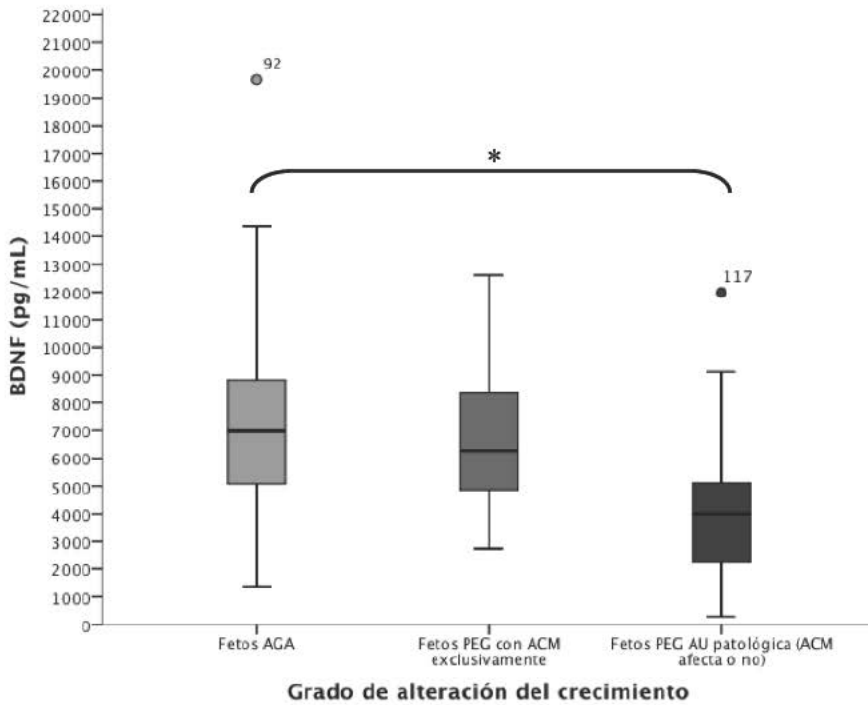


Figura 26. Diferencias en los niveles de BDNF en función de los distintos grados de alteración del crecimiento, \*significativo  $p=0,023$ .

Con el objetivo de evaluar la diferencia de BDNF entre los distintos estados de afectación ajustado para las variables antenatales que influyen los valores BDNF, realizamos una regresión lineal que se muestra en la Tabla 30 viendo que el ajuste para sexo, edad gestacional, y horas de bolsa rota mantenía la asociación estadística del estado Doppler Umbilical afecto con los niveles bajos de BDNF.

## Resultados

Tabla 30. Influencia de la alteración del crecimiento fetal en los niveles de BDNF ajustados para las variables prenatales que influenciaban en el análisis previo, mediante regresión lineal.

<b>Tabla 30</b>	<b>Coefficiente B no estandarizado</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>	<b>P</b>
Edad Gestacional (SG)	73	-123	269	0.463
Sexo Femenino	<b>1516</b>	<b>486</b>	<b>2546</b>	<b>0.004</b>
Más de 12 horas de bolsa rota	<b>2157</b>	<b>587</b>	<b>3726</b>	<b>0.007</b>
Fetos AGA (AU normal, ACM normal)	Ref	Ref	Ref	Ref
Fetos BPEG con AU normal y ACM patológica	-353	-2011	1304	0.674
Fetos BPEG con AU patológica (con o sin ACM patológica)	<b>-2055</b>	<b>-3827</b>	<b>-284</b>	<b>0.023</b>

Por otro lado, el análisis de la influencia del diagnóstico precoz de alteración de crecimiento (antes de las 32 semanas) no se relacionó con los niveles de BDNF cuando se analizó corregido para la edad gestacional como se puede ver en la Tabla 31.

Tabla 31: Relación de los niveles de BDNF en función de la alteración precoz del crecimiento.

<b>Tabla 31</b>	<b>Coefficiente B no estandarizado</b>	<b>p</b>
<b>Edad Gestacional (SG)</b>	411.660	0.003
<b>Alteración precoz del crecimiento (&lt;32s)</b>	-496.201	0.631

## Resultados

Respecto a la relación de la concentración de Reelina en función del grado de afectación de crecimiento fetal, la clasificación del grado de alteración de crecimiento fetal se realizó de la misma forma que en el análisis del BDNF. Tres categorías: Fetos AGA, Fetos BPEG con AU normal y ACM patológica, Fetos BPEG con AU patológica (con o sin ACM patológica). La distribución de los casos fue la que se muestra en la Figura 27.

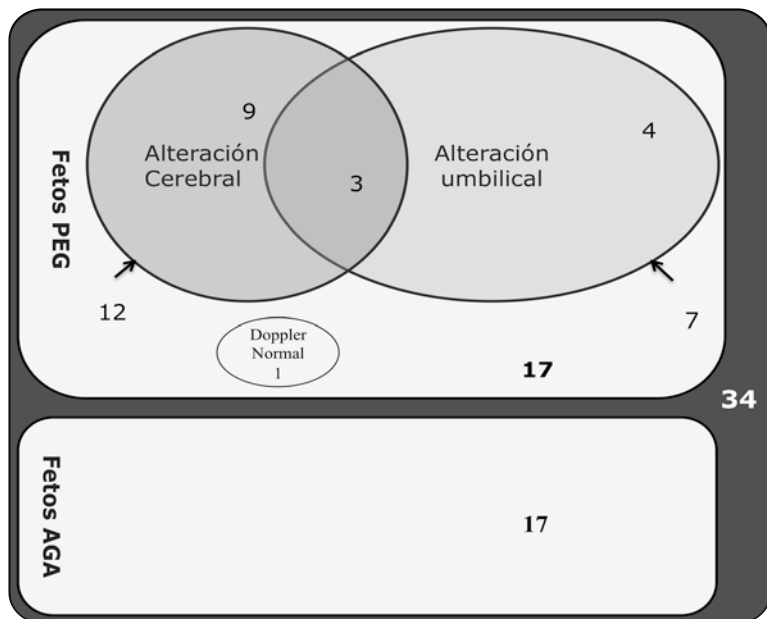


Figura 27. Distribución de los sujetos del análisis de la Reelina en función del grado de alteración del crecimiento.

Para el análisis estadístico, se evaluó el tipo de distribución que presentaba la muestra, obteniendo distribución normal obteniendo una distribución normal por la prueba de Shapiro-Wilk (Tabla 32).

Tabla 32. Análisis mediante regresión lineal, de la influencia de la alteración del crecimiento fetal en los niveles de BDNF ajustados para las variables prenatales identificadas en el análisis previo.

<b>Tabla 32. Grado de alteración del crecimiento</b>	<b>Shapiro-Wilk</b>
Fetos AGA	0.112
Fetos BPEG con ACM exclusivamente	0.455
Fetos BPEG AU patológica (ACM afecta o no)	0.885

En el estudio del Doppler se observó que la Reelina era superior en los fetos BPEG con vasodilatación cerebral en comparación con el resto de fetos, alcanzando esta relación significación estadística ( $p=0.024$ ) (Figura 28).

## Resultados

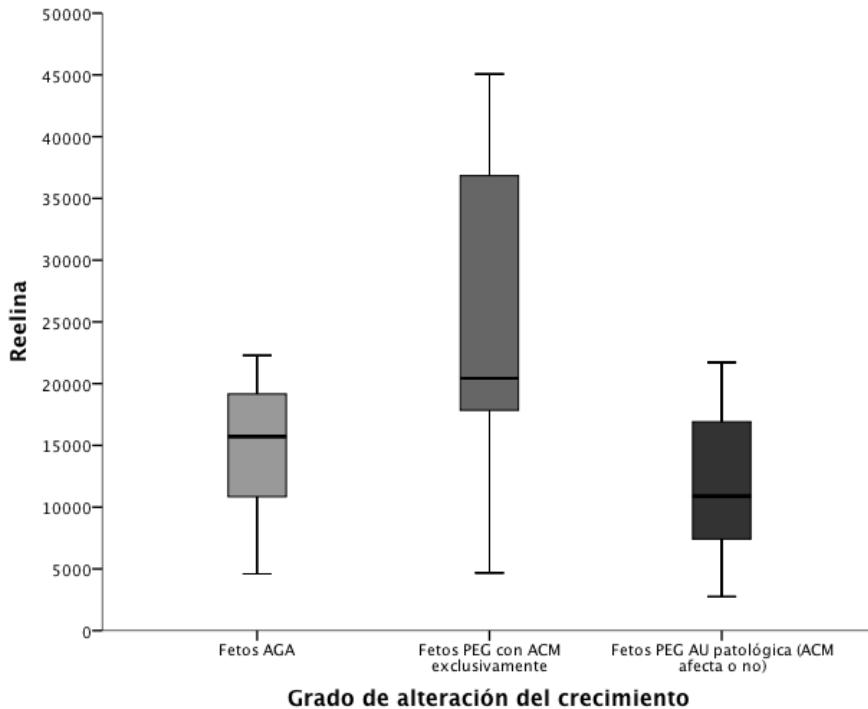


Figura 28. Diferencias en los niveles de Reelina en función de los distintos grados de alteración del crecimiento.

Al igual que para el análisis ajustado del BDNF, se realiza un análisis de Reelina ajustado para sexo y edad gestacional que se muestra en la Tabla 33 viendo que la significación estadística de la asociación del Doppler cerebral y la concentración de Reelina permanece ( $p=0.020$ ).

Tabla 33. Análisis mediante regresión lineal, de la influencia de la alteración del crecimiento fetal en los niveles de Reelina ajustados para las variables prenatales identificadas en el análisis previo.

<b>Tabla 33</b>	<b>Coefficiente B no estandarizado</b>	<b>Límite inferior</b>	<b>Límite superior</b>	<b>p</b>
Edad Gestacional (SG)	604	-669	1877	0.339
Sexo Femenino	1957	-4981	8895	0.568
Fetos BPEG con AU normal y ACM patológica	<b>9236</b>	<b>1545</b>	<b>16927</b>	<b>0.020</b>
Fetos BPEG con AU patológica (con o sin ACM patológica)	993	-10369	12355	0.859

La tendencia de ambas moléculas en los distintos grados de alteración de crecimiento se refleja en la Figura 29.

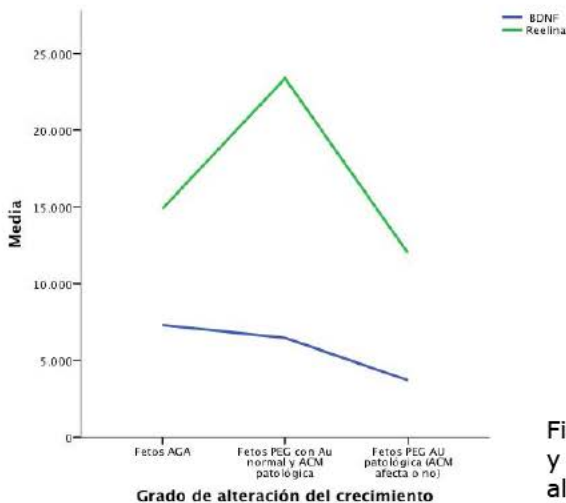


Figura 29. Comportamiento de la Reelina y del BDNF en función del grado de alteración del crecimiento.



## **6. DISCUSSION**

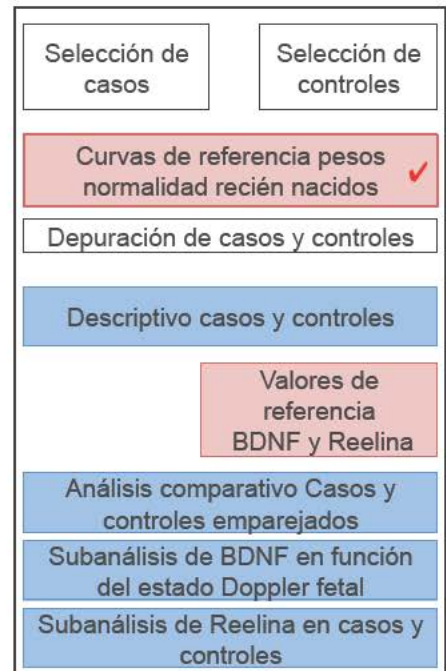


## 6. DISCUSIÓN

---

### 6.1 CURVAS DE PESO NEONATAL CUSTOMIZADAS PROPIAS Y APLICACIÓN DEL MODELO SOBRE NUESTRA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Nuestra primera parte del estudio, (elaboración de percentiles neonatales customizados), identifica variables maternas y obstétricas que influyen de forma significativa en el peso neonatal y describe un modelo de estimación de peso neonatal óptimo en función de éstas con una exhaustiva depuración ya que se eliminan cerca de un 28% de casos, obteniendo una población



libre de patología para definir valores de normalidad de las más numerosas previamente publicadas en España, con casi 35.000 casos.

## Discusión

Cada ámbito hospitalario tiene unas características poblacionales determinadas, y según el periodo, los flujos migratorios crean poblaciones con mayor o menor heterogeneidad. Por este motivo, en el diseño y utilidad de curvas de referencia poblacionales es imprescindible la identificación de variables que puedan modificar las distintas posibilidades de normalidad (124).

Una de las mayores ventajas de la aplicación de curvas customizadas de peso neonatal es la mejora en la identificación de recién nacidos de riesgo. La aplicación de dichas curvas a nuestra población estudiada nos garantiza poder identificar un crecimiento patológico que se sobreañade al valor del estado hemodinámico identificado mediante Doppler.

En nuestro estudio, identificamos variables influyentes ya conocidas, como la raza y la paridad y establecemos por primera vez, los coeficientes para etnias importantes en nuestra población como la magrebí y la sudamericana. Customizar para la raza materna es importante en la detección de fetos en riesgo(125).

Nuestro modelo, alcanzo un  $R^2$  de 0.192, inferior a los modelos customizados para variables antropométricas maternas(6) pero superior a los que solo incluyen el sexo fetal y la paridad.

No obstante, tanto los modelos customizados para altura y peso maternos como para solo etnia y paridad tienen un  $R^2$  que se sitúa alrededor de 0.17-0.30(6), por lo que otras variables desconocidas o de complicada identificación están involucradas en el peso neonatal óptimo. Mikolajczyk et al(123) en su estudio publicado en Lancet en 2011 observó que con la customización para la etnia materna mejoraba la clasificación de neonatos BPEG, mientras que al añadir más parámetros a la customización individual, mejoraba tímidamente hasta llegar a la customización total propuesta por Gardosi et al(126). Siguiendo esta corriente, y con el objetivo de completar las tablas de peso neonatal referencial publicadas por la Organización Mundial de la Salud, se diseñó el estudio Intergrowth-21. Dicho estudio concluyó en 2014 y tras la selección exhaustiva de población de mujeres gestantes procedentes de un ambiente idóneo y libre de noxas para el retraso de crecimiento intrauterino, de varios países y etnias.

Las curvas de referencia de peso neonatal se crearon para edad gestacional y sexo del recién nacido, no encontrando diferencias entre los distintos grupos étnicos y sin tener en consideración la paridad ni variables antropométricas.

## Discusión

Esto está en línea con la teoría del peso idóneo al nacimiento para la raza humana, donde si se eligen poblaciones sanas no haría falta customizar para las demás variables antes tomadas en consideración ya que no mejoraría la predicción del peso neonatal al nacimiento (127,128).

Esta corriente está en contraposición con la customización de las tablas de referencia poblacionales y ha sido discutida recientemente por Gardosi et al ya que no se incluyó en el estudio el perímetro abdominal, dato importante en el cálculo del peso fetal(129).

## 6.2. Comparación de los niveles de Reelina y BDNF en sangre de cordón entre recién nacidos BPEG y recién nacidos PAEG.

### 6.2.1. Análisis descriptivo individualizado de casos y controles.

#### a) Fetos BPEG.

La selección de los casos la realizamos mediante curvas customizadas propias, con una sola medida de PFE. Se ha visto que en fetos a término y con estudio Doppler

normal se mejora la predicción de mal resultado neonatal comparado con el estudio de la curva de crecimiento dinámica (130).

En el análisis de los 47 casos con BPEG, la media de edad materna fue superior a la media de nuestra población de referencia aunque no de forma clínicamente relevante (32 vs 31 años cumplidos).

Igualmente la incidencia de nuliparidad (55.7 vs 74.5%) también difería, ambas variables relacionadas con una mayor frecuencia de preeclampsia. Igualmente observamos una mayor frecuencia de preeclampsia, hipertensión arterial y

Selección de casos	Selección de controles
Curvas de referencia pesos normalidad recién nacidos	
Depuración de casos y controles	
Descriptivo casos y controles ✓	
Valores de referencia BDNF y Reelina	
Análisis comparativo Casos y controles emparejados	
Subanálisis de BDNF en función del estado Doppler fetal	
Subanálisis de Reelina en casos y controles	

## Discusión

diabetes, tal y como se conoce y se ha publicado en anteriores estudios (131,132), patología relacionada con la disfunción placentaria y vascular.

Del mismo modo, encontramos más antecedentes obstétricos como abortos de repetición e hipotiroidismo (133).

La variable horas de bolsa rota se trató como dicotómica (mayor o menor de 12 horas) ya que es lo que en meta-análisis publicados se valora como riesgo de corioamnionitis (134) aunque existen diversos puntos de corte analizados. En los fetos BPEG se obtuvieron casos con menor tiempo de rotura de membranas (menos de 12 horas) debido a que los fetos con menor duración de horas de bolsa rota fueron los que tenían riesgo de pérdida de bienestar fetal, como son los casos de retraso de crecimiento intrauterino, más frecuentes en los prematuros. En nuestro estudio se observó que los fetos BPEG tenían un parto más rápido que los de crecimiento PAEG.

El tratamiento con sulfato de magnesio durante el estudio tuvo la única indicación como profilaxis de la eclampsia, ya que todavía no se había instaurado la neuroprofilaxis neonatal, por ese motivo, dicho tratamiento solo se dio en los casos con preeclampsia severa que pertenecieron al grupo de casos con fetos BPEG (23.4%).

La cesárea electiva fue más frecuente respecto a nuestra población de referencia del periodo 2005-2011 (46.9 vs 21.1%) (Tabla 12). Debido a la prematuridad, la patología previamente descrita y al hecho de que en nuestra muestra de fetos BPEG el percentil customizado de peso al nacimiento más frecuente fue 0, casi la mitad de los casos tenían el Doppler umbilical afecto y cerca del 70% vasodilatación cerebral (Tabla 10) por lo que hace más difícil que se de un parto vaginal, tal y como se relata en la literatura(135). En nuestro centro, al igual que en otros, la alteración umbilical no es criterio de parto vaginal(136) pero se observó una tendencia lineal significativa de cesárea en curso de parto y cesárea electiva en los casos más graves con ausencia de flujo o reverso en arteria umbilical. Esta observación pudo ser origen de un sesgo al analizar las horas de bolsa rota de dichos fetos.

Respecto a la proporción de sexos, tuvimos más fetos masculinos en el grupo de BPEG (73 hombres frente al 36% mujeres) no pudiendo solventar dicha diferencia en la recogida de los sujetos a estudio ni ser explicada por una mayor prevalencia de retraso de crecimiento intrauterino en los fetos masculinos en la literatura médica ya que existen artículos que relatan una mayor frecuencia de bajo peso en fetos femeninos(137,138) pero por el contrario, los fetos masculinos

## Discusión

tienen mayor riesgo de mal resultado neonatal cuando su crecimiento intrauterino está afectado(139).

La edad gestacional fue menor en el grupo de fetos BPEG ya que no era un criterio de exclusión como en los fetos PAEG (media de 34.6 semanas), por ende obtuvimos diferencias en las variables subrogadas a ésta. La hemorragia intraventricular, que se asocia a inmadurez cerebral, principalmente prematuridad(140), se dio en 7 casos con una media de 32 semanas de gestación, aunque sorprendentemente solo un caso de hemorragia grado IV. También tuvimos mas reanimaciones medicalizadas 34% (tipo III y IV) y los ingresos en la UCI neonatal fueron en más de la mitad de la muestra (59%) (Tabla 9.3). La maduración pulmonar se administró en 21 fetos, 19 de éstos BPEG (10 de ellos con maduración corta de 12 horas). Los fetos que no pudieron ser madurados con ninguna dosis de corticoides fueron dos fetos BPEG de 29 y 34 semanas respectivamente, incidencia de 9.5%, similar a lo publicado en estudios de calidad y recomendado por la Joint Comission(141).

En el análisis bioquímico de los fetos BPEG, hay que tener en consideración también que la edad gestacional, a parte del percentil customizado, fue muy por debajo de la media en una

población normal, por lo que los valores obtenidos no pueden ser comparados con la normalidad. Las características bioquímicas que son inferiores a menor edad gestacional como la hemoglobina, hematocrito o los linfocitos, en nuestra serie fueron superiores. La serie roja debido a la presencia de retraso de crecimiento, acorde con lo publicado en la literatura(142). Dicha elevación es atribuida a un aumento de la eritropoyesis como resultado de una insuficiencia placentaria e hipoxia crónica, tal y como corresponde a fetos con alteración de crecimiento. A demás, sabiendo que la hemoglobina y el hematocrito aumentan con las semanas de embarazo, en nuestra serie de fetos BPEG tiene un comportamiento paradójico respecto a la normalidad. Los niveles de hemoglobina y porcentaje de hematocrito disminuyen conforme avanzan las semanas de embarazo. Esto es debido al fenómeno de hemoconcentración en los fetos con retraso de crecimiento, en nuestra serie, los casos con percentil customizado inferiores correspondían a edad gestacionales precoces, es decir los casos más severos fueron los más prematuros. Respecto a la serie blanca, en las series recogidas en la literatura médica, se caracteriza por ir en ligero aumento conforme avanza la edad gestacional, viendo que los fetos que nacen por parto vaginal tienen mayores cifras que los que nacen por cesárea electiva.

## Discusión

En nuestra serie de fetos BPEG, obtuvimos unos valores de leucocitosis (13677/ $\mu$ L) acorde a otras series como las previas citadas de Walka y Dallman (143,146). Los porcentajes de serie blanca y de neutrófilos aumentan y los de linfocitos disminuyen con la edad gestacional, al igual que se observa en las series publicadas (datos no publicados en esta memoria).

Con todas estas observaciones, nuestra muestra de fetos BPEG puede ser considerada correctamente catalogada como fallo de crecimiento ya que observamos se expresan alteraciones propias del retraso de crecimiento.

**b) Fetos PAEG**

Respecto a la segunda parte del estudio, del análisis descriptivo individualizado de los casos y controles y referidos en las Tablas 11.1-11.4 observamos que los 93 fetos PAEG tienen una edad materna similar a nuestra población de referencia tal y como se puede observar en la Tabla 12.

La edad gestacional no es comparable ya que se forzó el reclutamiento de todas las semanas de embarazo desde la 34, eliminando los de menos de 34 semanas como punto de corte para evitar analizar fetos con patología no diagnosticada prenatalmente que fuera causante de la prematuridad.

Respecto a la cesárea, en nuestros fetos PAEG tuvimos menos tasa global, con un 11.8% respecto a nuestra propia población que es de 21.1%, probablemente porque los criterios de exclusión de los fetos PAEG hacen más favorable un parto vaginal.

La incidencia de preeclampsia, a pesar de ser nula en nuestra muestra, así como de diabetes, que solo tuvimos dos casos, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la población de origen.

El resto de variables, como la toma de fármacos, o la presencia de antecedentes obstétricos no fueron recogidos en la población de origen por lo que no se pudieron comparar,

## Discusión

aunque tan solo tuvimos dos casos de abortos de repetición (dos o más), dos de hipotiroidismo y uno de hipertensión arterial, acorde con la necesidad de recoger controles libres de enfermedad.

Del mismo modo, la distribución del sexo fetal fue similar en las dos poblaciones.

El 6.5% de ingreso en la UCI se justificaría por el rango de edad gestacional de la muestra, ya que 25 fetos (27%) eran de menos de 37 semanas.

Respecto a la maduración pulmonar, a pesar de que se eliminaron los fetos de menos de 34 semanas, se recogió un caso donde se realizó maduración con corticoides antes de las 34 semanas y que el parto se produjo más tarde.

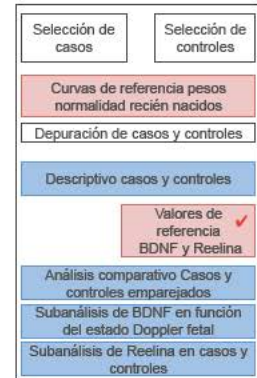
Correspondiente al análisis de las variables bioquímicas en los fetos PAEG, los valores de hemoglobina y hematocrito entran dentro de la normalidad de parámetros a pesar de ser una población heterogénea respecto a edad gestacional. La media de 15.67 gr/dl y 46.37% de hemoglobina y hematocrito respectivamente es similar a la reflejada en la literatura (15.9-15.5 gr/dl y 49% (144,145)), teniendo en cuenta nuestro 27% de prematuridad leve (34-37 semanas), ya que dichos parámetros disminuyen con la edad gestacional en fetos considerados PAEG.

El análisis de la serie blanca refleja el mismo comportamiento respecto a los valores de normalidad publicados, 15.733 por  $\text{mm}^3$  frente a los 14.200 de Walka et al(143) y los 18.100 de Dallman(146). La relación de dicho parámetro con la edad gestacional es estable, aunque el porcentaje de poblaciones de linfocitos y monocitos disminuye con las semanas de embarazo, el valor obtenido en nuestra serie es similar a los de referencia publicados en la literatura (51.99%, 35.64% y 8.1% frente a 61, 31 y 6% de Dallman et al)(146).

## **6.2.2. Valores de referencia del BDNF y Reelina en fetos PAEG**

### **a) Valores de referencia del BDNF.**

Hasta el momento, encontramos en la literatura tres artículos que evalúan el nivel de BDNF en sangre de cordón umbilical en función de la edad gestacional, clasificada en varios rangos ([24-40 semanas](95), [ $< 32$  semanas](92), [32-36 y  $> 36$  semanas](147)) cuya metodología y resultados vamos a utilizar para el análisis comparado con nuestro estudio. No obstante, existe controversia en la evolución de los valores de BDNF en función de la edad gestacional encontrando estudios contradictorios y cuyo objetivo final no fue valorar la normalidad del BDNF en gestaciones sin patología.



Nuestro estudio es el primero que analiza la distribución del BDNF por semanas de gestación en fetos sanos a término. Para la elaboración de curvas referenciales de BDNF eliminamos los fetos PAEG menores de 37 semanas y seguimos la metodología propuesta por Royston y Wright (121). Esto nos pareció fundamental para evitar analizar

sangre de cordón umbilical de fetos con alguna patología no diagnosticada que fuera posible etiología de la prematuridad por el hecho de que el prematuro sano no existe o es difícil seleccionarlo (127).

Matoba publicó en 2009 un estudio comparativo en función de distintos rangos de edad viendo que el BDNF era inferior en los fetos prematuros(147). Su media de BDNF en fetos a término (> 37 semanas) fue de 3097 ng/L que comparado con nuestra muestra difiere considerablemente (nuestra media fue de 7201 pg/mL).

En nuestro estudio, además de seleccionar los casos  $\geq 37$  semanas sin patología subyacente, se recogió el hemograma como control bioquímico, y se observó que el comportamiento de las variables bioquímicas respecto a la edad gestacional fue de acorde a la normalidad publicado en la literatura, este proceso ha sido omitido en los estudios de BDNF tal y como explica en la discusión Matoba, que relató la marcada variación del BDNF (percentil 10-90 de 700-9000 pg/L respectivamente) como consecuencia de poder tener muestras con patología subyacente no diagnosticada (corioamnionitis subclínica...).

En nuestro estudio, observamos que tanto la serie roja (hemoglobina, hematocrito) como los leucocitos y el porcentaje de neutrófilos, aumentan con la edad gestacional

## Discusión

como se puede observar en los gráficos de correlación (Figuras 20.1-20.5) y acorde a las publicaciones. El porcentaje de linfocitos es el parámetro de serie blanca que disminuye con la edad gestacional tal y como se ha explicado en el apartado anterior, que de igual forma sucedió en nuestro estudio, así como la ausencia de leucocitosis que pudiera sugerirnos una corioamnionitis subclínica, ya que es uno de los factores antenatales que pueden modificar los niveles de BDNF(148).

Considerando el comportamiento del BDNF, se observó que a mayor edad gestacional menor fue el nivel de BDNF, siendo dicha relación estadísticamente significativa. Este hallazgo es contrario a lo observado por el estudio de Mantoba et al(147), Malamitsi-Puchner et al(149) y Choutai et al(95). Este último, en su estudio publicado en 2003, que a diferencia del estudio de Matoba et al, no tubo como finalidad reflejar valores de referencia. Segmentó también su muestra en tres variables ordinales en función de las semanas de gestación al nacimiento y observó que los fetos de menos de 29 semanas tenían niveles inferiores de BDNF respecto a los de 29-35 semanas y éstos a su vez, menores de los recién nacidos de 36 o más semanas de gestación. Debido a que no analizó los valores de BDNF en fetos considerados como sanos y a término, hace que esta comparación no pueda ser considerada

como un comportamiento normal del BDNF, de la misma manera ocurre en el estudio de Malamitsi-Puschner et al de 2004.

Por otro lado, Rao et al, en su estudio publicado en 2009 con recién nacidos de menos de 32 semanas, no observó ninguna relación con la edad gestacional, tan solo con las horas de bolsa rota y la administración de corticoides antenatales. Una vez más, el objetivo del estudio no era valorar la normalidad, sino evaluar el comportamiento del BDNF postnatalmente. Su población fue pequeña (33 casos), con un 40% de preeclampsia, y 33% de sepsis neonatal, por lo que no es útil como referencia (92).

Por este motivo, es fundamental que los estudios que evalúan los niveles de BDNF en sangre de cordón estén ajustados para la edad gestacional correspondiente y seleccionados libres de patología.

Una forma de valorar el comportamiento de BDNF en función de la edad gestacional estudiando pretérminos libres de patología es evaluar el nivel de BDNF en el líquido amniótico de gestaciones que siguen en curso. Marx et al publicó en 1999 un estudio donde sí comprobó que los niveles de BDNF en líquido amniótico disminuían con la edad gestacional (148),

## Discusión

es el único estudio que está en concordancia con los resultados obtenidos en esta memoria.

Una justificación fisiopatológica de nuestro hallazgo es la teoría del “leaky brain” que postula la inmadurez de la angiogénesis cerebral y el paso de proteínas a través de la barrera hematoencefálica de forma descontrolada como causante del aumento de concentración de proteínas de origen neurológico en plasma de prematuros. No obstante esta teoría se ha puesto en entredicho con técnicas de inmunohistoquímica y estudios de transporte activo de proteínas, demostrando la existencia de tight junctions en el neuroendotelio, reguladores del flujo a través de la barrera hematoencefálica desde edades gestacionales tempranas (150,151).

Respecto a la influencia de las horas de bolsa rota, se incluyó en el análisis a raíz de que los dos estudios publicados por Chouthai et al y Rao et al valoraban dicha variable y tuvieron resultados contradictorios. Chouthai et al no encontraron diferencias en su estudio y Rao por el contrario, relacionó las horas de bolsa rota con niveles inferiores de BDNF. Su estudio solo incluía fetos de menos de 32 semanas, su muestra era escasa (33 RN) y no excluía la posibilidad de sesgo, ya que los

más prematuros pudieron ser los más patológicos, con preeclampsia severa y retraso de crecimiento intrauterino.

En nuestro estudio se obtuvieron valores de BDNF mayores cuanto mayor era la duración de bolsa rota, de forma significativa (Tabla 15 y Figura 17), dicha asociación observada resultó ser constante tras el ajuste. Esta relación se basa en la observación de estudios clínicos y epidemiológicos que han demostrado asociación significativa entre la infección materna y aumento de los niveles de citoquinas proinflamatorias en el cerebro fetal (152). Estos agentes pueden también aumentar la permeabilidad de la barrera hematoencefálica con una mejora de la infiltración de leucocitos del cerebro mediada por quimioquinas cerebrales. Aunque leve, esta reacción fetal inflamatoria puede ocurrir debido a que los microorganismos invasores entran en la cavidad amniótica y al feto por orden ascendente (153), aquí inducen una respuesta inmune innata con la consiguiente producción de citocinas proinflamatorias.

Por otro lado, cuando la presencia de inflamación se produce en ausencia de microorganismos (situaciones de hipoxia e isquemia) se ha observado un patrón elevado de citoquinas diferentes, la inmunoreactividad de TNFalfa es significativamente menor que en el grupo de inflamación

## Discusión

secundaria a presencia de microorganismos. Esto apoyaría los resultados obtenidos en los fetos con crecimiento alterado donde los niveles de BDNF son menores, probablemente porque las citoquinas estimuladas no tienen el mismo efecto que las elevadas en la inflamación-infección por microorganismos.

Respecto al sexo fetal, existen dos estudios donde no se observan diferencias en los niveles en función del sexo fetal (92,154), nosotros no evidenciamos diferencias significativas que recomendaran en el modelo de regresión incluir el sexo del recién nacido, aunque los niveles fueron superiores en los recién nacidos de sexo femenino al igual que encontraron Choutai et al en su estudio, aunque las diferencias que se encontraron no fueron significativas.

Con estos resultados respecto a las curvas referenciales de BDNF, se puede concluir que los niveles de BDNF en sangre de cordón al nacimiento van en disminución conforme aumenta la edad gestacional al parto, siendo este estudio el primero que analiza dicho comportamiento en población sana. El hecho de observar que más de 12 horas de bolsa rota eleva la media de BDNF de forma consistente, se recomienda tener en cuenta esta variable aunque el significado postnatal de dicha

influencia deba ser estudiado en el futuro. Así mismo, los fetos de sexo femenino presentan mayores niveles de BDNF aunque dicha diferencia no se consideró significativa en la muestra analizada.

Tabla 34: Resumen de los estudios publicados hasta la fecha sobre los niveles de BDNF en sangre de cordón en función de variables antenatales

<b>POBLACIÓN A</b>			
<b>AUTOR</b>	<b>ESTUDIO</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>CONCLUSIONES</b>
Marx et al 1999 (148)	LA de 102 gestaciones normales y 31 con alteraciones SNC. EG: 17 SG	Valorar presencia de BDNF y si se modifica con infección o alteraciones del SNC.	BDNF <b>disminuye</b> con la <b>EG</b> ( $r=-0.22$ ; $P=0.026$ ), y con la presencia de infección ( $p=0.36$ )
Chouthai et al 2003 (95)	60 muestras de sangre de cordón. Tres grupos de EG: <29, 29-36 >36 semanas	Valorar el comportamiento de BDNF en función de la EG y otras variables antenatales	BDNF <b>aumenta</b> con la <b>EG</b> clasificada como grupos de prematuridad. Las horas de <b>RPM</b> o el <b>CIR no afecta</b> .
Malamitsi -Puchner et al 2004 (154)	45 muestras de cordón: 30 a término, 15 pretérmino	Evaluar las diferencias de BDNF en función del grupo de EG	El grupo de <b>prematuridad</b> (media de 29 semanas) tuvo <b>menores</b> niveles de BDNF que los RN a término

<b>POBLACIÓN A</b>			
<b>AUTOR</b>	<b>ESTUDIO</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>CONCLUSIONES</b>
Malamitsi -Puchner et al 2007 (155)	60 muestras de sangre de cordón: 30 CIR 30 PAEG.	Evaluar las diferencias entre fetos CIR y PAEG. Ambos grupos igual Doppler umbilical	<b>No encuentra diferencias</b> entre fetos <b>CIR</b> y PAEG.
Wang et al 2008 (156)	51 RN a término divididos por percentil (PEG, PAEG y GEG), 8 PEG.	Relación del peso y BDNF en tres grupos	BDNF es <b>superior</b> en fetos <b>PEG</b> comparado con el resto
Mantoba et al 2009 (147)	927 muestras de sangre de cordón. Varios grupos de prematuridad: EG <32, 32-37 y >37 SG	Identificar diferentes patrones de marcadores inmunológicos según EG.	BDNF <b>disminuido</b> en fetos <b>prematuros</b>
Rao et al 2009 (92)	3 muestras de sangre de cordón de RN < 32 semanas,	Cambios postnatales en función de variables perinatales	Los niveles de BDNF <b>no cambian por EG</b> , sólo por horas de <b>RPM</b> y <b>maduración</b> pulmonar

Continuación Tabla 34: Resumen de los estudios publicados hasta la fecha sobre los niveles de BDNF en sangre de cordón en función de variables antenatales

POBLACIÓN A			
AUTOR	ESTUDIO	OBJETIVO	CONCLUSIONES
Kumar et al 2011 (157)	200 muestras de sangre de cordón de RN con EG entre 24 y 34 SG.	Efecto de los corticoides sobre distintas citoquinas.	Los niveles de BDNF eran <b>iguales</b> independientemente del tratamiento con <b>corticoides</b> o presencia de <b>inflamación</b> placentaria
Mantoba et al 2011 (158)	Muestras de sangre de cordón de RN a término: 319 PAEG y 74 PEG.	Diferencias entre PEG o AGA en función de percentil customizado, no incluyen Doppler	Niveles de BDNF están <b>disminuidos</b> en fetos <b>PEG</b> .

Continuación Tabla 34: Resumen de los estudios publicados hasta la fecha sobre los niveles de BDNF en sangre de cordón en función de variables antenatales

### **6.2.3. Análisis comparativo de casos y controles emparejados**

Previo a la mejora en las técnicas de RM y de inmunohistoquímica, la afectación neurológica de los fetos con retraso de crecimiento o prematuridad se centraba en el estudio de la sustancia blanca. La existencia de leucomalacia periventricular, lesión de la matriz germinal y hemorragia intraventricular eran las variables que se manejaban en este tipo de pacientes.

A partir de la introducción de modelos animales como ovejas o roedores, donde se provoca artificialmente hipoxia crónica y retraso de crecimiento mediante distintas técnicas, es posible estudiar los mecanismos por los cuales se producen las lesiones neuronales en fetos afectados de CIR.

Estudios en ratas han observado que la expresión de neurotrofinas está disminuida, migración neuronal alterada y menor índice de mielinización (51,159,160).

Bajo el concepto de que los niveles de BDNF en torrente sanguíneo son reflejo de los niveles de BDNF intracerebral(161) se han desarrollado estudios en humanos donde se correlacionan los niveles de BDNF con distintas patologías prenatales.

El tratamiento con sulfato de magnesio como indicación de neuroprofilaxis se ha visto que eleva los niveles de BDNF en fetos prematuros comparados con los que no reciben neuroprofilaxis(91).

Ante la posibilidad de valorar el nivel de BDNF como un marcador de lesión neurológica y la importancia de que la comparación con sujetos sanos fuera ajustada para la edad gestacional, (dada la variabilidad del BDNF en función de ésta) se diseñó el análisis comparativo de casos y controles emparejados.

No fue posible el emparejamiento del 100% de las muestras recogidas, se consiguió emparejar el 75% de los casos con el 37% de los controles ya que fue difícil encontrar fetos de menos de 37 semanas sanos. Como se comprobó que el BDNF se correlaciona de forma significativa e inversamente proporcional con la edad gestacional, el ajuste de casos y controles por esta variable queda claramente justificado. Sin embargo, no hemos demostrado que tal ajuste pueda ser necesario por sexo dado que no encontramos correlación del BDNF/sexo recién nacido, posiblemente debido al escaso grupo reclutado.

## Discusión

No se pudo emparejar para la variable horas de bolsa rota. Ya comentado en el apartado previo, los fetos BPEG tuvieron una mayor incidencia de cesáreas electivas con el consiguiente menor número de horas de bolsa rota. No obstante, el ajuste por horas de bolsa rota mediante regresión lineal solo modificaba la significación de la relación entre linfocitos y caso-control, convirtiéndola en no significativa (dato no mostrado). El resto de las relaciones permanecieron igual por lo que no se consideró importante el ajuste por dicha variable.

Las diferencias observadas en los grupos caso y control fueron las relacionadas con el criterio de selección. Se ha demostrado que la nuliparidad se asocia a mayor frecuencia de preeclampsia(162). La edad materna fue superior en los casos, pero no alcanzo significación estadística. También se ha visto que la edad se asocia con más patología materna y por tanto el uso de al menos algún fármaco estudiado. Sibai et al y múltiples autores, han demostrado la asociación de preeclampsia con prematuridad y bajo peso para la edad gestacional así como el hipotiroidismo y la diabetes, esta última por vasculopatía materno-placentaria (10).

Otros resultados coherentes con la literatura actual son los que analizan las variables perinatales con menor porcentaje de

bolsa rota y de parto vaginal en los casos vs los controles(163). La administración de sulfato de magnesio se dio en los casos con preeclampsia por lo que ningún feto PAEG se trató.

Queremos destacar que no encontramos diferencias entre los dos grupos a estudio respecto a la maduración pulmonar, debido a la edad gestacional ( $\geq 34$  sg). Esto es importante porque Rao et al encontró que los niveles de BDNF se ven afectados por el uso de corticoides. Nosotros tan solo tuvimos dos casos de maduración en los fetos PAEG que aunque nacieron más allá de las 34 semanas, habían recibido maduración previa.

Como era de esperar, a pesar de estar corregida la edad gestacional, las diferencias en las medidas de tamaño y peso perinatales para casos y controles fueron significativas, así como el perímetro cefálico al igual que lo encontrado por Malamitsi-Puchner et al y Chouthai et al (95,164), más aún considerando los percentiles customizados (2 vs 58;  $p < 0.0001$ ). Esto último implica, además de por el estado Doppler antenatal, que escogimos casos severos, con mayor frecuencia de percentiles bajos.

## Discusión

En relación a las variables clínicas neonatales de bienestar fetal intraparto como es el test de Apgar al minuto y a los cinco minutos y pH de arteria umbilical, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos a pesar de que el pH arterial en recién nacidos con BPEG fue menor que los PAEG.

Considerando los criterios estrictos de percentil y Doppler fetal cabría esperar una mayor diferencia pero no obstante se ha visto que el estado ácido-base de los fetos con retraso de crecimiento intrauterino se relaciona con el ductus venoso patológico como variable antenatal, tal y como estudió Baschat et al(61) y en nuestro estudio tuvimos tan solo dos casos con alteración del ductus venoso. Estos resultados nos satisfacen por la salud perinatal, sin embargo diversos autores encuentran resultados distintos. En concreto Malamitsi-Puchner en su estudio, encontró diferencias significativas en el pH de arterial umbilical(164) siendo que aplicó unos criterios de selección caso-control más laxos que el nuestro, aunque en ningún grupo se alcanzó acidosis neonatal.

A pesar de estos buenos resultados en cuanto a bienestar fetal, sí observamos diferencias en los distintos tipos de reanimación. Esto pone de manifiesto que en los casos se observan una mayor dificultad adaptativa a la vida

extrauterina con mayor frecuencia de reanimación médica de segundo y tercer nivel (tipo II y III) (165). Esto es acorde a los protocolos de reanimación neonatal, que consideran el retraso de crecimiento una patología de riesgo con mayor necesidad de reanimación neonatal avanzada (166).

De la misma manera, el porcentaje de ingreso en la UCI neonatal fue mayor en los casos (47.2 vs 8.3%) aunque las complicaciones neonatológicas, que se analizaron globalmente, no mostraron diferencias significativas entre los dos grupos. Sin embargo, llama la atención sobretodo la existencia de hemorragia intraventricular en un 8.6% de los casos frente al 2.8% de los controles, tal y como se relata en la literatura médica, identificando el retraso de crecimiento como un factor de riesgo importante en la hemorragia intraventricular(140).

En el análisis bioquímico de sangre venosa umbilical obtuvimos las diferencias significativas esperadas entre los casos y controles para el nivel de hematocrito y hemoglobina (17 gr/dl frente a 15.4 y 51% frente a 45) tal y como se explica en la literatura médica y se ha relatado en el apartado previo. Pero por el contrario, tuvimos un sujeto con sepsis postnatal en los casos, sin existir diferencias en los marcadores de infección entre casos y controles dejando atrás

## Discusión

los posibles sesgos que la inflamación por infección pudiera tener sobre los niveles de BDNF.

Finalmente, en cuanto a los niveles de BDNF, encontramos mayores niveles en los fetos PAEG versus BPEG pero con una diferencia cercana a la significación ( $p=0.073$ ). Esto probablemente fue debido a la falta de potencia estadística por el tamaño muestral, ya que el análisis comparativo se compuso de 36 sujetos por cada rama a pesar de que los sujetos BPEG se consideraron con una afectación importante del crecimiento y la magnitud de la diferencia fuera menor de la esperada.

En la Tabla 20 se refleja el hecho de que la afectación Doppler estaba presente en un 75% de la muestra, teniendo vasodilatación cerebral en casi la mitad de los casos (41.7%) y alteración del Doppler umbilical en más de un tercio de los fetos BPEG. Este criterio de selección es más estricto que el utilizado en los estudios que evalúan las diferencias de BDNF en función del tipo de crecimiento.

Malamitsi-Putscher et al en su estudio de 2007 seleccionaron fetos BPEG que a pesar de catalogarse como tal con percentiles customizados por el programa GROW de Gardosi et al(126), tenían el mismo Doppler umbilical que los casos.

Otro estudio más laxo en el criterio de selección de fetos BPEG que el nuestro fue el de Chouthai et al(95) que tampoco utilizaron el Doppler prenatal y tampoco encontró diferencias entre los fetos BPEG y los PAEG.

Por el contrario, Matoba et al en 2011, a pesar de que en el criterio de selección de los fetos BPEG no utilizaron el valor Doppler, sí que encontró diferencias en los niveles de BDNF entre fetos BPEG y PAEG, probablemente debido a que la clasificación de los percentiles se realizó con tablas referenciales propias customizadas y que dicho estudio constó de un tamaño muestral considerable (393 controles y 74 casos) muy superior al nuestro ya que no consideró necesario ajustar para la edad gestacional al realizarse en fetos a término (158).

De los cuatro estudios originales publicados para el estudio de BDNF en fetos BPEG, a pesar de que en tan solo Matoba et al logran significación estadística, la tendencia es que el BDNF es inferior en los fetos con afectación del crecimiento intrauterino. Se hace difícil demostrar diferencias sobretodo porque es necesario el ajuste para edad gestacional y cuando en un estudio no es necesario, es porque son fetos a término, como en el de Matoba et al. Al recoger fetos a término BPEG, se asume la condición de que dicha alteración de crecimiento

## Discusión

no es lo suficientemente severa por el hecho de alcanzar el término gestacional, sobretodo si no se incluye las variables Doppler. Por ese motivo, es necesario realizar estudios con muestras voluminosas y con afectaciones de crecimiento en sus rangos más severos. Mas adelante, en el apartado de la evaluación Doppler se explican las diferencias encontradas en este tipo de análisis.

El análisis comparativo de casos y controles emparejados para el estudio de la Reelina no se pudo realizar debido al escaso tamaño muestral (34 casos y no emparejados). Por ese motivo se remite al apartado "6.2.5. Determinación de Reelina en relación a las variables de estudio en el total de la muestra" para un estudio más a fondo de dicha molécula dentro de las limitaciones de la técnica y la muestra.

#### **6.2.4. Determinación del BDNF en relación a las variables de estudio en el total de la muestra**

Otro enfoque analítico del BDNF, al igual que realizó Chouthai et al, fue identificar las distintas variables antenatales que pudieran modificar los niveles de BDNF en los neonatos. La mayoría de las que se identificaron como modificadores significativos estaban relacionadas entre sí. Compartían tres mecanismos comunes e íntimamente relacionados: la prematuridad, la inflamación-infección y el retraso de crecimiento intrauterino, tal y como identificaron Sibai et al(10).

Los antecedentes obstétricos de riesgo de anomalías en la placentación, la existencia de marcadores de síndrome metabólico como la diabetes o la hipertensión, el riesgo infeccioso como la rotura prematura de membranas prolongada, los leucocitos, o la prematuridad y todas sus variables subrogadas se asociaron a niveles distintos de BDNF de varias magnitudes en el análisis univariante.

A diferencia de lo obtenido por Rao y de similar forma que en el estudio de Chouthai, no se encontraron diferencias de BDNF en presencia de hemorragia intraventricular aunque la tendencia fue la disminución de BDNF en los casos con HIV, que fueron tan sólo 6 (Tabla 23.3), dicho evento está en

## Discusión

relación con la inmadurez del SNC como la prematuridad y las fluctuaciones del flujo cerebral sobre la matriz germinal (167) por lo que tampoco se puede afirmar de nuestra observación que los niveles de BDNF sean inferiores por la presencia de lesión vascular periventricular.

La presencia de hipotiroidismo también se analizó por separado, ya que hay estudios que relacionan el hipotiroidismo y la regulación negativa del BDNF(168). En la serie presentada, tan solo se dieron 7 casos con hipotiroidismo y la concentración de BDNF fue inferior en ellos (4318 frente a 6724 pg/dL).

Debido a que muchas de estas variables interaccionan o se relacionan entre sí, como el tratamiento con sulfato de magnesio y la presencia de prematuridad o preeclampsia, o el ingreso en UCI con la edad gestacional y el retraso de crecimiento... etc. se ajustó el efecto de dichas variables antenatales mediante regresión logística en la Tabla 24. Tan sólo se observó significación en el sexo del RN, las horas de bolsa rota y los leucocitos. Estas dos variables, relacionadas con la inflamación aunque intraparto, están en consonancia con los estudios animales que demuestran que el insulto infeccioso provoca un aumento en la expresión de BDNF (93) a

diferencia de los estudios heterogéneos en humanos antes expuestos.

El hecho de encontrar que el sexo femenino asocia un mayor nivel de BDNF que no encontramos en el análisis de normalidad puede ser debido al tamaño muestral de la normalidad, ya que la tendencia era la misma, o más allá, debido a que tuvimos más RN de sexo masculino en el grupo BPEG, puede ser que exista un efecto género-modulador de la expresión de BDNF por la presencia de estrógenos tal y como se ha visto en los adultos (Figura 30) (169).

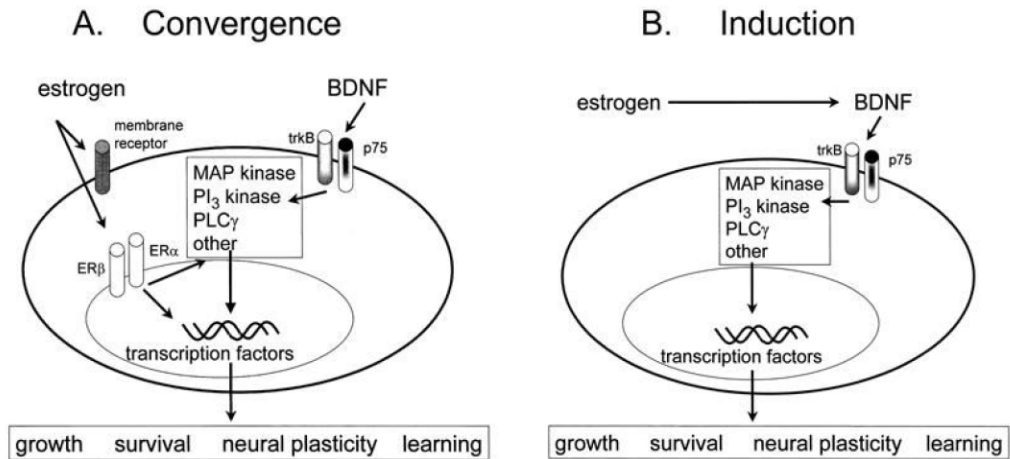


Figura 30. Mecanismo molecular de interacción de los estrógenos con el BDNF. Scharfman et al (19)

## Discusión

El modelo final, respetando el principio jerárquico al incluir el percentil neonatal por ser criterio definitorio de caso-control, resultó constante la significación para las horas de bolsa rota una vez más, así como para el sexo y los niveles leucocitos.

El ingreso en UCI es una variable que depende, entre otras covariables de la edad gestacional, según las series, mas de un 65% de los ingresos son prematuros (170), al contrario que las semanas de gestación cumplidas que marca la madurez de forma progresiva, el ingreso en UCI refleja de forma mas drástica la madurez del RN a modo de variable "composite". Al ser una variable postnatal, en un modelo predictivo no tendría sentido pero se mantuvo al ser un modelo con finalidad explicativa de los niveles de BDNF, aunque es una variable subrogada de la edad gestacional y el retraso de crecimiento.

En este apartado se identificaron las posibles variables modificadoras de los niveles de BDNF, útil conocerlas para realizar ajustes en estudios de poblaciones heterogéneas cuando se analizan otras condiciones antenatales como el estado Doppler fetal que se analizará posteriormente en el apartado 6.2.6.

### **6.2.5. Determinación de Reelina en relación a las variables de estudio en el total de la muestra**

La tercera parte de la memoria, el análisis de la proteína extracelular Reelina, es el primer estudio donde se analizan los niveles periféricos de esta proteína en recién nacidos, relacionándolos con el estado del crecimiento intrauterino patológico. Ante la realidad estudiada sobre los fetos afectos de BPEG y el neurodesarrollo alterado, se planteó que los niveles de Reelina, una proteína involucrada en la migración, organización cortical y la sinapsis intraútero pudieran estar en distinta concentración en función del tipo de crecimiento intraútero.

El análisis descriptivo de la muestra no facilitó ninguna variable influenciadora en los niveles de Reelina. A diferencia del comportamiento del BDNF, la Reelina se vio independiente de las variables prenatales estudiadas. No obstante, existen estudios en la literatura donde se ha observado que el mecanismo de señalización denominado Reelin-Dab y explicado en el apartado de introducción, está influenciado por la hormona tiroidea. El hipotiroidismo reduce la expresión de Reelina y estimula la expresión del receptor Dab1 durante el neurodesarrollo (171). Incluso se ha estudiado el efecto que

## Discusión

tiene la administración exógena de hormona tiroidea en los niveles de Reelina en ratas (172). En nuestra serie, se analizó por separado el hipotiroidismo con la variable Reelina debido a estas evidencias publicadas, pero tan sólo obtuvimos un caso de hipotiroidismo en la muestra analizada. El nivel de Reelina fue de casi tres veces menor que en los 32 casos que no estaban diagnosticados de hipotiroidismo (6.888 frente a 17.120) pero debido al número, la prueba estadística no fue significativa (Figura 24.1)

Prenatalmente, también se han identificado otros factores modificadores de la expresión de Reelina. Todos los estudios se centran en análisis tisulares (Northern blot, Western blot e inmunohistoquímica...) y en ratones. El alcohol se ha visto induce la expansión de las principales neuronas productoras de Reelina (Cajal-Retzius) en la capa I de neuropilo (173) y la infección provocada artificialmente por los lipopolisacáridos induce a una reducción en la expresión de Reelina y a una alteración en la organización de las células piramidales en el hipocampo (174) (175). En nuestro estudios excluimos las pacientes que habían tomado algún tipo de droga en la entrevista inicial del estudio por lo que no se analizó dicha variable y la presencia de corioamnionitis fue un criterio de exclusión.

Respecto al campo de investigación psiquiátrica, se ha estudiado los niveles de Reelina en cerebros de pacientes con trastorno del espectro autista, bipolar, esquizofrenia, Alzheimer y depresión mayor con resultados diversos (176). Los resultados son diversos, sobretodo porque el análisis tisular permite individualizar los niveles de Reelina en distintas regiones como el hipocampo, córtex frontal... etc. (120). Al no ser objetivo de este estudio, no se profundiza en estos estudios, aunque cabe remarcar que la mayoría reflejan una disminución de los niveles de Reelina en la depresión mayor, autismo y trastorno bipolar (a nivel tisular y plasmático) salvo los estudios de Fatemi et al (111) que reflejan un aumento plasmático de la Reelina en la esquizofrenia y en el tejido cerebral de pacientes con Alzheimer por estudios de Botella-Lopez et al (177).

Prenatalmente, el estudio de la variación de la Reelina en sangre de cordón se reduce a un solo artículo donde evalúa los niveles de Reelina en RN de madre en tratamiento con inhibidores de la recaptación de serotonina (IRS). Los RN de madres con tratamiento de IRS tenían menores niveles de Reelina en sangre de cordón al nacimiento, comparados con los hijos de madres sin tratamiento. Estas diferencias fueron más marcadas en RN de sexo femenino(178).

## Discusión

Este estudio favorece el impulso de investigaciones en sangre de cordón ya que las diferencias observadas tras un tratamiento psiquiátrico hacen sospechar que los niveles de Reelina periféricos son reflejo de los niveles en el SNC. Se sabe que la Reelina se produce también fuera del SNC, como en el hígado, líquido sinovial, plaquetas...(105) pero es en la etapa prenatal donde su producción es mayor. El hecho de evidenciar por inmunohistoquímica y microscopía electrónica la presencia de Reelina en el endotelio del SNC aboga por el paso de dicha molécula a través de la barrera hematoencefálica (104).

Otro factor antenatal estudiado sobre la influencia en la Reelina durante el neurodesarrollo prenatal es la hipoxia, ante la teoría de que el estrés fetal influye sobre el desarrollo cerebral a nivel celular, molecular y epigenético(179). En modelos de hipoxia postnatal de roedores se ha visto que la expresión de Reelina en las interneuronas corticales está aumentada, sobretodo en el córtex motor y somatosensorial (74). Otro estudio también postnatal mediante modelo de lesión isquémica cerebral por termocoagulación, observó un aumento de la expresión de Reelina local. Dicho estudio concluía con el papel regenerador de la Reelina, al incentivar la migración y la remielinización a partir de la neurogénesis en

la corriente migratoria rostral del adulto(103). Por el contrario, en otro estudio prenatal en un modelo diferente de retraso de crecimiento ocasionado por restricción protéica en roedores, se observó que la expresión de Reelina por las interneuronas del giro dentado no se modificaba, aunque no se llegó a evaluar otras zonas cerebrales (180). Estas diferencias en los resultados pueden ser debidas a que el efecto de la hipoxia sobre la Reelina depende de la zona del SNC analizada. Golan et al evaluaron el efecto de la hipoxia en su modelo de roedores viendo que había una sobreexpresión de Reelina en el córtex y por el contrario había una disminución de la concentración en el hipocampo(51). Otro estudio en consonancia con el anterior fue el publicado por Curristin et al donde en un modelo roedor de hipoxia preletal postnatal se observó una inhibición del gen codificador de la Reelina en córtex e hipocampo con la consiguiente disminución de ésta en el análisis inmunohistoquímico (98).

Esta serie de estudios conlleva a deducir que el ambiente adverso perinatal provoca sustanciales cambios en la expresión de Reelina en distintos modelos de hipoxia en roedores.

Los resultados diferentes pueden ser debidos a que la Reelina tiene varias formas de modificarse en función de la severidad

## Discusión

del insulto prenatal, así como también en función de la zona del SNC analizada, el tipo de análisis que se realiza (tisular o plasmático) o el peso molecular analizado de la proteína (180 KDa, 320 KDa o 400 KDa).

En nuestro estudio, la variable acorde a la hipoxia fue el bajo peso para la edad gestacional. No obtuvimos diferencias significativas entre los dos grupos (14873 en fetos PAEG y 17920 en fetos BPEG). El pH arterial al nacimiento tampoco se identificó como una variable influenciadora. Considerando la presencia de hemorragia intraventricular como un marcador de hipoxia severo, sí que obtuvimos diferencias, que a pesar de tener solo dos casos y que no alcanzaron significación estadística. Los dos RN con HIV presentaron una Reelina tres veces menor que el resto de los RN analizados (Tabla 26.3 y Figura 25.2). Para evaluar más a fondo el papel de la hipoxia en el contexto de RN con BPEG, en el siguiente apartado se discute la relación de la Reelina con el grado de alteración de crecimiento marcado por la afectación Doppler.

### **6.2.6. Papel del Doppler en los niveles de BDNF y Reelina.**

#### **BDNF y Doppler**

Todos los artículos publicados en la literatura sobre los niveles de BDNF y crecimiento intrauterino retardado a pesar de ser estudios heterogéneos con distintas edades gestacionales, tamaño muestral o patología de base, difícilmente comparables, tienen un resultado común. Tan sólo el estudio de Matoba et al(158) pudieron demostrar estadísticamente que el BDNF estaba disminuido en los recién nacidos que no alcanzaron su potencial de crecimiento (3041 en fetos PAEG versus 2143 pg/mL en fetos BPEG) pero la tendencia es que los fetos con retraso de crecimiento, ya sea diagnosticado como percentil menor del 10 poblacional, customizado o con alteración Doppler, el BDNF está disminuido en sangre de cordón.

Viendo dicha tendencia en nuestra muestra, subclasificamos a los recién nacidos BPEG en función del resultado Doppler prenatal (dicho resultado Doppler se obtuvo en una mediana de 24 horas antes del parto). La clasificación elegida se basó en el deterioro Doppler fetal progresivo de los fetos BPEG. Se ha estudiado las distintas progresiones que pueden tener estos fetos, viendo que los fetos que presentan retraso de

## Discusión

crecimiento de forma precoz (“early fetal growth restriction”) su deterioro Doppler es más brusco, alterándose primero la arteria umbilical y posteriormene de forma rápida (menos de 7 días) la arteria cerebral media(181). Por el contrario, los fetos que presentan retraso de crecimiento de forma tardía (“late fetal growht restriction”) el deterioro Doppler es más prolongado, incluso algunos fetos no desarrollan alteraciones umbilicales, tan solo tienen alterado el índice cerebroplacentario y posteriormente el Doppler cerebral (182). En nuestra memoria, clasificamos a los RN en función de la edad gestacional al diagnóstico (Tabla 31), viendo que los RN que habían sido diagnosticados antes de las 32 semanas de gestación tenían niveles de BDNF inferiores pero sin significación estadística. Dicho análisis tubo que ser ajustado para la edad gestacional ya que los RN de diagnóstico precoz eran mas prematuros.

Este análisis en función del grado de alteración Doppler, al no tratarse de casos emparejados por edad gestacional ni sexo, se ajustó por las variables que identificamos como posibles modificadoras en el apartado previo. Se observó la tendencia decreciente del BDNF en los distintos grados de alteración Doppler, viendo que los RN con afectación de la arteria umbilical tenían niveles significativamente inferiores respecto a los fetos PAEG. Los RN BPEG con vasodilatación tenían 353

pg/mL menos que los PAEG, y los RN BPEG con vasoconstricción umbilical tenían 2055 pg/mL menos de media que los RN PAEG.

El hecho de que los RN con retraso de crecimiento presenten un neurodesarrollo postnatal alterado puede tener una base molecular con el BDNF involucrado en él. El papel biológico prenatal del BDNF abarca desde la estimulación de la neurogénesis, mielinización hasta la estimulación de la conectividad (Tabla3), por lo que estos procesos podrían verse comprometidos en RN con retraso de crecimiento intrauterino y reflejarse en una alteración postnatal.

Respecto a las explicaciones dadas en los estudios donde no se encontraron diferencias del BDNF, cabe destacar que el efecto vasodilatador se consideró beneficioso y así se justificó que no se alteraran los niveles de BDNF(164). En nuestro estudio, observamos una disminución progresiva, por lo que la vasodilatación remarca un estadio más de la alteración del crecimiento intrauterino, siendo una fase previa a la vasoconstricción umbilical pero con consecuencias bioquímicas observables.

Esta apreciación no apoya la teoría de la inocuidad del "Brain sparing" como mecanismo compensador de la disminución de

## Discusión

aporte de oxígeno y nutrientes al SNC. La vasodilatación cerebral se considera un mecanismo compensatorio para intentar preservar la perfusión cerebral pero hay en la actualidad numerosos estudios que relacionan la alteración del neurodesarrollo con dicha condición(65). Existe el daño evidente que se puede observar por ecografía, como la lesión de la sustancia blanca, la hemorragia periventricular o las lesiones quísticas, pero a medida que avanza la medicina se estudian sujetos con el espectro de la enfermedad no tan extremo como la afectación umbilical. En este tipo de pacientes se centran los estudios en la actualidad. Los sujetos con vasodilatación cerebral han sido estudiados con espectrofotometría observando que su patrón metabólico cerebral está alterado (183).

## **Reelina y Doppler**

Observamos que los niveles de Reelina en sangre venosa umbilical eran superiores de forma significativa en los RN BPEG afectos de vasodilatación cerebral comparados con los RN que no tenían vasodilatación cerebral (Figura 27). Por otro lado, al comparar los RN afectos de alteración umbilical observamos que los niveles de Reelina eran inferiores respecto a los fetos que no poseían afectación umbilical. Este último resultado no alcanzó significación estadística.

Estos hallazgos son de significación compleja y apoyan distintas interpretaciones:

1. La primera está en consonancia con los artículos publicados que remarcan el hecho de que la vasodilatación cerebral es un estadio más del retraso de crecimiento intrauterino y que, tal y como se ha visto en los estudios que evalúan el neurodesarrollo de estos fetos, la compensación cerebral no llega a todas las funciones cerebrales observadas en los test de desarrollo neurológico (65). Por ese motivo, se pueden evidenciar alteraciones metabólicas cerebrales en RN con redistribución cerebral (184) evidenciadas por espectometría al igual que en esta memoria, donde la Reelina esta sobreexpresada en RN con redistribución cerebral.

## Discusión

2. La segunda es que al ser el SNC el origen de la Reelina, un feto afecto de vasodilatación cerebral puede experimentar un mayor paso de Reelina al torrente circulatorio general, siendo este hecho de consecuencias inciertas. Es posible que disminuya el nivel de Reelina intracerebral y por ende deteriorar su función de señal organizativa en la migración neuronal radial y madurativa dendrítica.

3. La última interpretación de este resultado relaciona ambas moléculas estudiadas. Se sabe que el BDNF es un regulador negativo de la producción de Reelina por las neuronas Cajal-Retzius, de forma experimental se ha observado que en ratones con ausencia de BDNF existen niveles de Reelina aumentados en las células Cajal-Retzius(83).

En esta memoria, los fetos con vasodilatación cerebral tuvieron la Reelina periférica aumentada, siendo que los niveles de BDNF estaban disminuidos (Figura 29). Por el contrario, en fetos con alteración umbilical, la Reelina está disminuida, al igual que el BDNF.

Este escenario (vasoconstricción umbilical) fue el único en que ambas proteínas estaban disminuidas. Se podría interpretar como una última fase de alteración, donde a pesar de estar

disminuido el BDNF, (donde la afectación del crecimiento es más severo), las células Cajal-Retzius ya no pueden sobreexpresar más Reelina. Esto estaría en consonancia con el hecho de que en este estudio se observó una disminución posterior de la Reelina al presentarse vasoconstricción umbilical, considerado como un grado mayor del retraso de crecimiento.

Estudios posteriores sobre la migración neuronal, su organización y maduración así como sus proteínas señal, deberán contemplar mayor recogida de casos para poder formar grupos homogéneos y consistentes.

La dificultad de los estudios sobre la Reelina, a pesar de haber avanzado en los últimos años, radica en el gran tamaño de la molécula, la falta de anticuerpos monoclonales que abarquen una amplia gama de epitopos, la presencia de múltiples productos resultados de la proteólisis de la proteína y la inestabilidad del tamaño completo una vez secretada y aislada (107).

## Discusión

### 6.3 Aplicaciones clínicas

La aplicación de las curvas referenciales customizadas poblacionales mejoran la precisión diagnóstica del RN BPEG segregándolo del RN constitucionalmente pequeño para una vigilancia Doppler más estrecha.

Los niveles de BDNF inferiores pueden servir de utilidad para:

- Identificar a los sujetos con riesgo de alteración del neurodesarrollo posterior tal y como se ha propuesto usar en pacientes adultos con traumatismo cerebral donde el BDNF se ha visto refleja daño neuronal(185).
- Valorar la efectividad de nuevos tratamientos neuroprotectores al comparar la diferencia de sus niveles.

## Discusión

#### **6.4. Nuevas líneas de investigación.**

- En los casos de retraso de crecimiento intrauterino, donde se ha demostrado una falta de nutrientes de forma crónica, puede ser un objeto de estudio el administrar neurotrofinas tal y como se ha estudiado en pacientes que han sufrido un infarto cerebral isquémico (186).
- La línea de investigación abierta que relaciona las neurotrofinas con el síndrome metabólico, basada en la neuroinmunoendocrinología sustenta que el déficit metabotrófico se basa en los niveles reducidos de neurotrofinas hace que el BDNF se le implique un papel en la patogénesis del síndrome metabólico debido a su relación con las citoquinas proinflamatorias y la alteración del eje hipotálamo-hipofisario.

Por esta línea de investigación el retraso de crecimiento intrauterino es una condición patológica fetal que tiene consecuencias neurológicas y metabólicas con un mecanismo común.(187,188)

## Discusión

### **6.5. Limitaciones del estudio.**

- Para la elaboración de las curvas poblacionales de peso neonatal, no se recogió el hábito tabáquico y otras variables antropométricas como la altura y el peso materno.
- Nuestra población de fetos pequeños para edad gestacional a pesar de estar catalogados por percentiles customizados propios, no incluían exclusivamente crecimiento intrauterino restringido entendido como tal sujetos con afectación umbilical si no que también se incluyeron recién nacidos con afectación exclusivamente cerebral, así como sólo el percentil al nacimiento disminuido, formando una muestra heterogénea, no obstante más restrictiva que la mayoría de estudios que analizan factores neurotróficos donde suelen utilizar solo el percentil neonatal.
- Existe un sesgo desde la selección de los casos en el servicio de ecografía, donde los fetos BPEG son con afectación severa hemodinámica, la mayoría tienen alteración hemodinámica a diferencia de la población fetal general. Por eso se muestra el espectro más grave

## Discusión

de la enfermedad. Nuestros resultados deben de ser validados ya que muestran los espectros más extremos de la alteración de crecimiento.

- La selección de controles se realizó en la Unidad de Partorio, que tras cumplir los criterios de inclusión, no fue de forma aleatoria, si no de forma nominal, en las guardias de la doctoranda principalmente y dado que no se tienen otras muestras no se ha podido realizar un análisis de subgrupos y disminuir la extrapolación de los resultados.
- Los recién nacidos clasificados como PAEG, se asumió que el Doppler tanto umbilical como cerebral fue normal, esto puede tener algún sesgo ya que se dan casos donde los recién nacidos con peso adecuado, a pesar de ser clasificado con curvas de referencia propias y customizadas, pueden presentar alguna alteración Doppler subclínica como la vasodilatación cerebral o Índice Cerebro Placentario alterado.
- No se pudo utilizar el Índice Cerebro Placentario, esto fue debido a que la variable Doppler antenatal, tanto umbilical como cerebral, se recogió de forma dicotómica,

ya que no se dispuso del valor absoluto en todos los sujetos a estudio.

- El número de sujetos reclutados parece ser inferior al que necesitaríamos para confirmar estadísticamente la tendencia del BDNF en el análisis de casos y controles emparejados.
- Es probable que al haber almacenado las muestras durante 5 años, a pesar de estar almacenadas en ultracongelador de  $-80^{\circ}\text{C}$  y seguir las recomendaciones de Lugli et al (119) hayan podido afectar los niveles medidos de cada molécula. Sin embargo esto es frecuente en los estudios de casos en los que para utilizar la prueba se necesita coleccionar un número suficiente antes de realizar el procedimiento analítico.
- No se realizó seguimiento postnatal más allá de los 4 meses del alta en UCI. Podría ser interesante realizar una comparación de los niveles de BDNF y Reelina al nacimiento con pruebas neurológicas postnatales, al año y dos años, ya que se considera importante la vinculación de nuestros resultados con el desarrollo postnatal.

## **7. CONCLUSIONES**



## 7. CONCLUSIONES

---

- Se establecen los percentiles 10 y 90 de peso neonatal y de peso fetal estimado a partir de 35.000 pacientes de un mismo centro (HGUGM).
- La raza y la paridad son factores relacionados con la predicción de peso neonatal por lo que la inclusión de estas variables mejoran la clasificación del peso al nacimiento hasta un modelo con  $R^2$  de 0.192.
- Los niveles de BDNF en sangre de cordón de RN BPEG son menores que los de RN PAEG, siendo esta diferencia estadísticamente significativa en los RN BPEG con afectación del índice de pulsatilidad de la arteria umbilical.
- Los niveles de BDNF en sangre de cordón de recién nacidos sanos disminuyen con la edad gestacional. Dicha observación se realizó en fetos sanos a término ( $\geq 37$  SG).

- Los niveles de BDNF en sangre de cordón de RN PAEG son superiores en gestaciones con más de 12 horas de rotura de membranas, de forma estadísticamente significativa y en RN de sexo femenino sin significación estadística.
- Los niveles de Reelina en sangre de cordón no están influenciados por ninguna variable antenatal en nuestra serie de forma estadísticamente significativa, salvo por la presencia de vasodilatación cerebral en RN BPEG que asocia una elevación de dicha proteína.
- El hipotiroidismo y la hemorragia intraventricular se asociaron a niveles de Reelina bajos, pero debido al escaso número reclutado con dichas características, no se pudo confirmar estadísticamente dicha asociación.



## **8. ANEXOS**



## 8. ANEXOS

### ANEXO I

**CONSENTIMIENTO INFORMADO**

**PACIENTE**

**NÚMERO**

**Título del Estudio:** “Evaluación de los niveles de Reelina y factores neurotróficos en sangre de cordón umbilical en relación con el crecimiento intrauterino restringido.”

**Documento de consentimiento informado para el estudio ecográfico y Doppler fetal de fetos afectos de retraso de crecimiento y fetos sanos, así como para la obtención de sangre de cordón y datos perinatales.**

Doña: \_\_\_\_\_ de: \_\_\_\_\_ años de edad

Declaro que el Dr./a: \_\_\_\_\_

(Nombre y dos apellidos del facultativo que proporciona la información)

Me ha informado de la posibilidad de colaborar en este estudio, cuya finalidad es evaluar los niveles de factores neurotróficos en sangre de cordón de fetos con retraso de crecimiento y su relación con los datos obtenidos en el estudio ecográfico fetal y las variables postnatales.

En mi caso concreto el objeto de este estudio es:

Paciente **SANA** control

Paciente con feto **BPEG** caso

Se me ha explicado, he comprendido y aceptado que:

- 1 Tras el parto, se procederá a extraer alrededor de 20 ml de sangre de cordón umbilical, procedimiento NO invasivo ni perjudicial para el bienestar de mi hijo y el mío propio.
2. Se me han respondido las cuestiones que se me han planteado en el momento de ser informada de forma satisfactoria.
3. La información que se recoja sobre mí o mi futuro hijo es confidencial y no será utilizada ni cedida para otros fines sin mi permiso.
4. Soy libre de abandonar el estudio en cualquier momento. En caso de que eligiera no completar el estudio, no se vería afectada la calidad de la asistencia médica de mi embarazo.

Y en tales condiciones

**CONSIENTO**

Participar en el estudio **“Evaluación de los niveles de Reelina y factores neurotróficos en sangre de cordón umbilical en relación con el crecimiento intrauterino restringido.”**

En Madrid; a ..... de ..... de 20 \_\_\_\_

(lugar y fecha)

**Fdo. EL MÉDICO**

**Fdo. LA PACIENTE Y DNI**

## **Artículo I. HOJA DE INFORMACIÓN A LA PACIENTE**

### **Título del Estudio:**

**“EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE REELINA Y FACTORES NEURÓTRÓFICOS EN SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL EN RELACIÓN CON EL CRECIMIENTO INTRAUTERINO RESTRINGIDO.”**

Le proponemos participar en un estudio de investigación cuyo objetivo es evaluar los niveles de varios factores neurotróficos en sangre de cordón de fetos afectos de retraso de crecimiento intrauterino y su relación con el estudio ecográfico prenatal y el resultado perinatal.

Para participar en este estudio debe de leer atentamente este impreso que el médico le ha dado, y una vez comprendido lo que supone su participación y si usted esta de acuerdo, firmar el consentimiento informado y fecharlo.

En este estudio participaran aproximadamente 100 mujeres cuyo control obstétrico se realiza en el Hospital Universitario Gregorio Marañón.

Se le propone este estudio porque está entre las semanas 28 y 41 de su embarazo. Su caso puede servir como modelo de gestación normal por ser un embarazo que ha transcurrido sin complicaciones, o por el contrario, su caso puede servir como objeto de estudio ya que se le ha

diagnosticado de un feto con un peso estimado menor a lo esperado según sus semanas de embarazo.

Participar en este estudio supone realizar un estudio ecográfico fetal y extraer tras el parto, sangre de cordón umbilical. Ambos procedimientos carecen de complicaciones y no son procedimientos inasivos ni para usted ni para su futuro hijo.

En todo momento puede solicitar explicaciones a su médico sobre el desarrollo del estudio. Y después, sólo si está de acuerdo con lo que se le propone, será incluido en él.


Tiene que saber que la participación en el estudio es voluntaria y que, si decide participar, tiene la posibilidad de retirarse del estudio en cualquier momento sin perjuicio alguno, sin tener que dar explicaciones y sin que ello afecte a su relación con sus médicos, así como si acepta su participación, no obtendrá ningún beneficio personal.

Los datos del estudio son confidenciales, y sólo tendrán acceso a ellas los investigadores y el personal encargado de garantizar la calidad de los datos y el análisis de los mismos. Su nombre no aparecerá en ninguna información ni publicación sobre el estudio. Su información personal no estará disponible al público, cumpliendo lo establecido en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de datos de Carácter Personal.

Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario Gregorio Marañón.

El investigador responsable del estudio es la **Dra. Jara Pascual Mancho**, que le responderá a cualquier duda que tenga sobre él, con el que puede contactar en el teléfono: **91 529 00 59**

## ANEXO II. Documento aceptación CEIC-A1.




**Hospital General Universitario  
Gregorio Marañón**

Comunidad de Madrid

OFICINA TÉCNICA - COMITÉ DE ÉTICA  
DEL HOSPITAL GREGORIO MARAÑÓN

01 JUN. 2009

SALIDA Nº 590



**DICTAMEN DEL COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA**

D. Fernando Díaz Otero, Presidente del **COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA - ÁREA 1**

CERTIFICA

Que ha evaluado la propuesta del promotor referida al estudio:

**TÍTULO:** "Evaluación de los niveles de reelina y factores neurotróficos en sangre de cordón umbilical en relación con el crecimiento intrauterino restringido"

**PROMOTOR:** Investigador


considera que :

- El estudio se plantea siguiendo los requisitos legalmente establecidos, y su realización es pertinente.
- Se cumplen los requisitos necesarios de idoneidad del protocolo en relación con los objetivos del estudio y están justificados los riesgos y molestias previsibles para el sujeto.
- Es adecuado el procedimiento para obtener el consentimiento informado.
- El alcance de las compensaciones económicas previstas no interfiere con el respeto a los postulados éticos.
- La capacidad del investigador y sus colaboradores, y las instalaciones y medios disponibles, tal y como ha sido informado, son apropiados para llevar a cabo el estudio.
- Además, el citado CEIC cumple las normas de BPC (CPMP / ICH / 135 / 95).

Este CEIC acepta que dicho estudio sea realizado por el investigador principal:

Dra. Jara Pascual Mancho / Servicio de Obstetricia y Ginecología / Hospital General Universitario Gregorio Marañón

Lo que firmo en Madrid, a 28 de mayo de 2009



Fdo: Dr. Fernando Díaz Otero

N.E.:

C.I. 89/09

C.P.:

C/ Dr. Esquerdo 46. Pabellón de Gobierno. Planta baja. 28007 Madrid  
 ceic.hguigm@salud.madrid.org Tel. 91-586 70 07 - Fax 91-400 61 56

### ANEXO III

<b>ESTUDIO FACTORES NEUOTRÓFICOS Y CIR</b>	
<b>HOJA DE RECOGIDA DE DATOS</b>	
<b>PACIENTE NÚMERO:</b>	<input type="text"/>
<b>ETIQUETA PACIENTE</b>	<input type="text"/>
<b>EDAD GESTACIONAL:</b>	_____ . _____
<b>FUR:</b>	____ / ____ / ____
<b>SEXO FETAL:</b>	
<b>PFE:</b>	.....
<b>DOPPLER</b>	<b>IP AU</b> .....
	<b>IP ACM</b> .....
	<b>IP DV</b> .....
<b>DATOS RELEVANTES Hº ECOGRÁFICA ACTUAL:</b>	..... ..... .....
<b>DATOS RELEVANTES Hº CLÍNICA:</b>	..... ..... .....

# ANEXO IV. FICHA TÉCNICA ANTICUERPO ANTI-REELINA.



## MOUSE ANTI-REELIN MONOCLONAL ANTIBODY

<b>CATALOG NUMBER:</b>	MAB5366
<b>LOT NUMBER:</b>	
<b>QUANTITY:</b>	100 µg
<b>CONCENTRATION:</b>	1 mg/mL
<b>SPECIFICITY:</b>	Reelin. The epitope is between amino acids 164 and 189.
<b>IMMUNOGEN:</b>	Recombinant reelin amino acids 40-189.
<b>ISOTYPE:</b>	IgG <sub>1c</sub>
<b>CLONE:</b>	142
<b>APPLICATIONS:</b>	Western blot Immunohistochemistry Optimal working dilutions must be determined by the end user.
<b>SPECIES REACTIVITIES:</b>	Rodent. The antibody also shows good reactivity to human and non-mammals.
<b>FORMAT:</b>	Purified immunoglobulin.
<b>PRESENTATION:</b>	Liquid in 0.02M Phosphate buffer with 0.25M NaCl and 0.1% sodium azide.
<b>STORAGE/HANDLING:</b>	Maintain at 2-8°C in undiluted aliquots up to 6 months after date of receipt
<b>REFERENCES:</b>	de Bergeyck et al., <i>J. Neuroscience Methods</i> (1998) <b>82</b> :17-24. Steckelbroeck, S. et al., <i>J. Neurochemistry</i> (2004) <b>89</b> :403-417. Botella-Lopez, A., et al., <i>PNAS</i> (2006) <b>103</b> :5573-5578. Bystron, I., et al., <i>Nature Neuroscience</i> (2006) <b>9</b> :880-886.
<b>RELATED REFERENCES:</b>	D'Arcangelo et al., <i>Neuron</i> (1999) <b>24</b> :471-479. Rice et al., <i>Neuron</i> (2001) <b>31</b> :929-941.

**Important Note:** During shipment, small volumes of product will occasionally become entrapped in the seal of the product vial. For products with volumes of 200 µL or less, we recommend gently tapping the vial on a hard surface or briefly centrifuging the vial in a tabletop centrifuge to dislodge any liquid in the container's cap.

CHEMICON has a complete listing of our affinity purified second antibodies and conjugates listed in our Immunological Reagents Catalog. CHEMICON Technical Service would be happy to assist you in selecting an appropriate antibody for your system. Call our Technical Service Department for additional information now at 1-800-437-7500.

*For research use only; not for use as a diagnostic.*

© 2003-2006: CHEMICON International, Inc. - By CHEMICON International, Inc. All rights reserved. No part of these works may be reproduced in any form without permissions in writing.  
USA & Canada • Phone: +1(800) 437-7500 • Fax: +1 (951) 676-9209 • Europe +44 (0) 23 8026 2233  
Australia +61 3 9839 2000 • Germany +49-6192-207300 • ISO Registered worldwide  
www.chemicon.com • custserv@chemicon.com • techserv@chemicon.com

Anexos

## ANEXO V. FICHA TÉCNICA ANTICUERPO ANTI BDNF.

<http://www.rndsystems.com/pdf/DBD00.pdf>

# Quantikine® ELISA

## Human BDNF Immunoassay

Catalog Number DBD00  
SBD00  
PDBD00

For the quantitative determination of human Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) concentrations in cell culture supernates, serum, and platelet-poor plasma.

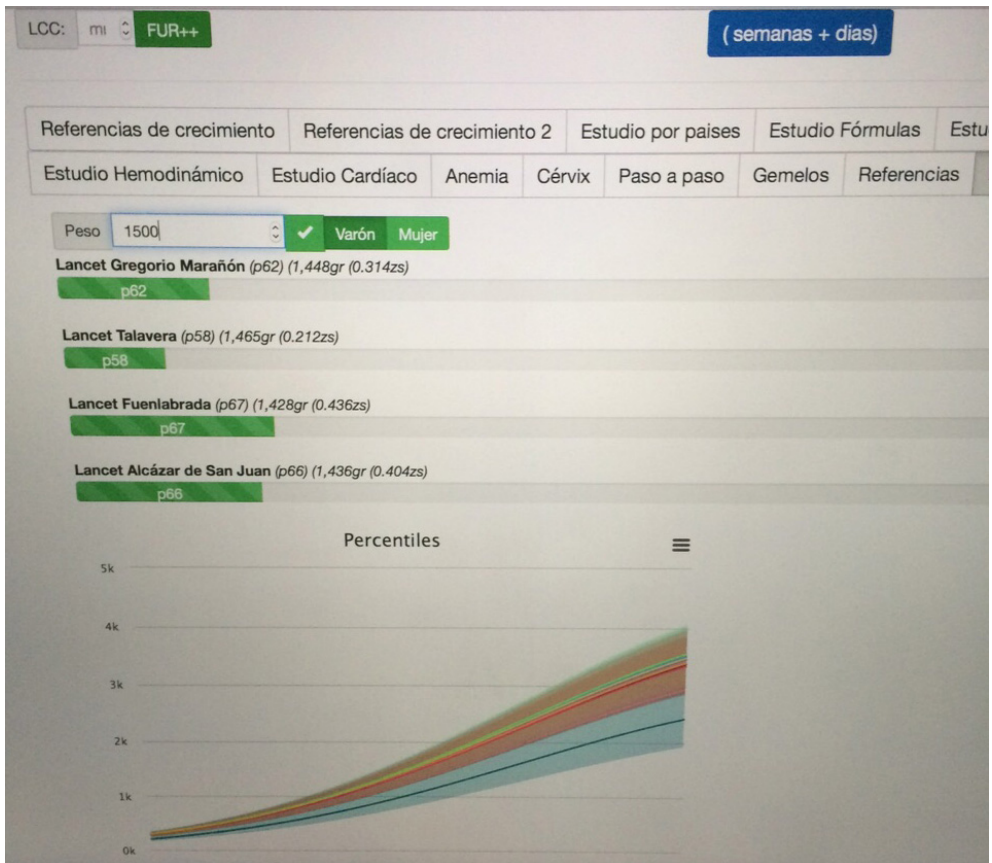
**Note:** The standard reconstitution method has changed. Please read this package insert in its entirety before using this product.

This package insert must be read in its entirety before using this product.  
For research use only. Not for use in diagnostic procedures.

### ANEXO VI. IMAGEN WESTERN-BLOT REELINA.



## ANEXO VII. IMAGEN PROGRAMA INFORMÁTICO CALCULADORA DE PERCENTIL PESO FETAL Y PESO NACIMIENTO.



## **9. DIFUSION DEL ESTUDIO**



## 9. DIFUSIÓN DEL ESTUDIO

---

- La creación de una herramienta informática que permite el cálculo automático del percentil de peso neonatal y fetal en función de las variables maternas y fetales se ha creado para uso del personal sanitario del Hospital Universitario Gregorio Marañón, de referencia en esta memoria.
- En el 12th World Congress of Perinatal Medicine se presentaron dos trabajos a raíz de esta memoria, uno de ellos candidato a premio mejor comunicación oral:
  - Cord blood Reelin protein in newborns with cerebral vasodilation is increased compared to newborns without.
  - Brain derived neurotrophic factor (BDNF) is decreased in growth restricted newborns with abnormal umbilical artery Doppler.



## **10. BIBLIOGRAFIA**



## 10. BIBLIOGRAFÍA:

---

1. Dunn PM. The Search for Perinatal Definitions and Standards. *Acta Paediatrica*. 1985 May;74(s319):7–11.
2. Gardosi J. Clinical strategies for improving the detection of fetal growth restriction. *Clinics in Perinatology*. 2011 Mar;38(1):21–31.
3. Gardosi J. Prematurity and fetal growth restriction. *Early Human Development*. 2005 Jan;81(1):43–9.
4. Hadlock FP, Harrist RB, Martinez-Poyer J. In utero analysis of fetal growth: a sonographic weight standard. *Radiology*. 1991 Oct;181(1):129–33.
5. Clausson B, Gardosi J, Francis A, Cnattingius S. Perinatal outcome in SGA births defined by customised versus population-based birthweight standards. *BJOG*. 2001 Aug;108(8):830–4.
6. Gardosi J, Figueras F, Clausson B, Francis A. The customised growth potential: an international research tool to study the epidemiology of fetal growth. *Paediatr Perinat Epidemiol*. 2010 Oct 18;25(1):2–10.
7. Savchev S, Figueras F, Sanz-Cortes M, Cruz-Lemini M, Triunfo S, Botet F, et al. Evaluation of an optimal gestational age cut-off for the definition of early- and late-onset fetal growth restriction. *Fetal Diagn Ther*. 2014;36(2):99–105.
8. Parra-Saavedra M, Crovetto F, Triunfo S, Savchev S, Peguero A, Nadal A, et al. Placental findings in late-onset SGA births without Doppler signs of placental insufficiency. *Placenta*. Elsevier Ltd; 2013 Oct 16;:1–6.
9. Lin CC, Santolaya-Forgas J. Current concepts of fetal growth restriction: part I. Causes, classification, and pathophysiology. *Obstetrics & Gynecology*. 1998 Dec;92(6):1044–55.
10. Ness RB, Sibai BM. Shared and disparate components of the pathophysiologies of fetal growth restriction and preeclampsia. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2006 Jul;195(1):40–9.
11. Holcberg G, Huleihel M, Sapir O, Katz M, Tsadkin M, Furman B, et al. Increased production of tumor necrosis factor-alpha TNF-alpha by IUGR human placentae. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001 Jan;94(1):69–72.

## Bibliografía

12. Parham P, Guethlein LA. Pregnancy immunogenetics: NK cell education in the womb? *J Clin Invest*. 2010 Nov 1;120(11):3801–4.
13. Damsky CH, Fisher SJ. Trophoblast pseudo-vasculogenesis: faking it with endothelial adhesion receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1998 Oct;10(5):660–6.
14. Bdolah Y, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia: newer insights. *Semin Nephrol*. 2004 Nov;24(6):548–56.
15. Crocker IP, Cooper S, Ong SC, Baker PN. Differences in apoptotic susceptibility of cytotrophoblasts and syncytiotrophoblasts in normal pregnancy to those complicated with preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Am J Pathol*. 2003 Feb;162(2):637–43.
16. Hung T-H, Skepper JN, Charnock-Jones DS, Burton GJ. Hypoxia-reoxygenation: a potent inducer of apoptotic changes in the human placenta and possible etiological factor in preeclampsia. *Circ Res*. 2002 Jun 28;90(12):1274–81.
17. Yung H-W, Calabrese S, Hynx D, Hemmings BA, Cetin I, Charnock-Jones DS, et al. Evidence of placental translation inhibition and endoplasmic reticulum stress in the etiology of human intrauterine growth restriction. *Am J Pathol*. 2008 Aug;173(2):451–62.
18. D'Anna R, Baviera G, Corrado F, Leonardi I, Buemi M, Jasonni VM. Is mid-trimester maternal serum inhibin-A a marker of preeclampsia or intrauterine growth restriction? *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2002 Jun;81(6):540–3.
19. Smith GCS. Early Pregnancy Levels of Pregnancy-Associated Plasma Protein A and the Risk of Intrauterine Growth Restriction, Premature Birth, Preeclampsia, and Stillbirth. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2002 Apr 1;87(4):1762–7.
20. Lindqvist PG, Molin J. Does antenatal identification of small-for-gestational age fetuses significantly improve their outcome? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2005 Mar;25(3):258–64.
21. Figueras F, Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011 Apr;204(4):288–300.
22. Hadlock FP, Harrist RB, Sharman RS, Deter RL, Park SK. Estimation of fetal weight with the use of head, body, and femur measurements--a prospective study. *YMOB*. 1985 Feb 1;151(3):333–7.

23. Mongelli M, Ek S, Tambyrajia R. Screening for fetal growth restriction: a mathematical model of the effect of time interval and ultrasound error. *Obstetrics & Gynecology*. 1998 Dec;92(6):908–12.
24. Giles WB, Trudinger BJ, Baird PJ. Fetal umbilical artery flow velocity waveforms and placental resistance: pathological correlation. *BJOG*. Blackwell Publishing Ltd; 1985 Jan 1;92(1):31–8.
25. Sebire NJ, Sepulveda W. Correlation of placental pathology with prenatal ultrasound findings. *J Clin Pathol*. 2008 Jul 19;61(12):1276–84.
26. MRCOG PSR, FRCOG NDWM, MRCOG DRM, Birmingham. The Investigation and Management of the Small-for-Gestational-Age Fetus. 2014 Jan;21:1–34.
27. Nicolaides KH, Bilardo CM, Soothill PW, Campbell S. Absence of end diastolic frequencies in umbilical artery: a sign of fetal hypoxia and acidosis. *BMJ*. 1988 Oct 22;297(6655):1026–7.
28. Baschat AA, Weiner CP. Umbilical artery doppler screening for detection of the small fetus in need of antepartum surveillance. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2000 Jan;182(1 Pt 1):154–8.
29. Schlembach D, Wallner W, Sengenberger R, Stiegler E, Mörtl M, Beckmann MW, et al. Angiogenic growth factor levels in maternal and fetal blood: correlation with Doppler ultrasound parameters in pregnancies complicated by pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2007;29(4):407–13.
30. Reuwer PJ, Sijmons EA, Rietman GW, van Tiel MW, Bruinse HW. Intrauterine growth retardation: prediction of perinatal distress by Doppler ultrasound. *Lancet*. 1987 Aug 22;2(8556):415–8.
31. Roza SJ, Steegers EAP, Verburg BO, Jaddoe VWV, Moll HA, Hofman A, et al. What Is Spared by Fetal Brain-Sparing? Fetal Circulatory Redistribution and Behavioral Problems in the General Population. *American Journal of Epidemiology*. 2008 Oct 9;168(10):1145–52.
32. Eixarch E, Meler E, Iraola A, Illa M, Crispi F, Hernandez-Andrade E, et al. Neurodevelopmental outcome in 2-year-old infants who were small-for-gestational age term fetuses with cerebral blood flow redistribution. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Dec;32(7):894–9.
33. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. Hypertension in pregnancy: the management of hypertensive disorders during pregnancy. National Institute for Health and Clinical Excellence; London: 2010. p. CG107.

## Bibliografía

34. Ortigosa C, Nomura RMY, Costa VN, Miyadahira S, Zugaib M. Fetal venous Doppler in pregnancies with placental dysfunction and correlation with pH at birth. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2012 Dec;25(12):2620–4.
35. Kaukola T, Rasanen J, Herva R, Patel DD, Hallman M. Suboptimal neurodevelopment in very preterm infants is related to fetal cardiovascular compromise in placental insufficiency. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2005 Aug;193(2):414–20.
36. Marsoosi V, Bahadori F, Esfahani F, Ghasemi-Rad M. The role of Doppler indices in predicting intra ventricular hemorrhage and perinatal mortality in fetal growth restriction. *Med Ultrason*. 2012 Jun;14(2):125–32.
37. Ferrazzi E, Bozzo M, Rigano S, Bellotti M, Morabito A, Pardi G, et al. Temporal sequence of abnormal Doppler changes in the peripheral and central circulatory systems of the severely growth-restricted fetus. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2002 Feb;19(2):140–6.
38. Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB. A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. *Brain*. 2012 Apr 27;135(5):1348–69.
39. Tissir F, Goffinet AM. Reelin and brain development. *Nat Rev Neurosci*. 2003 Jun;4(6):496–505.
40. Marín O, Valiente M, Ge X, Tsai L-H. Guiding neuronal cell migrations. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2010 Feb;2(2):a001834.
41. Franco SJ, Müller U. Extracellular matrix functions during neuronal migration and lamination in the mammalian central nervous system. Prokop A, Reichardt LF, editors. *Devel Neurobio*. 2011 Oct 11;71(11):889–900.
42. Zanin E, Ranjeva J-P, Confort-Gouny S, Guye M, Denis D, Cozzone PJ, et al. White matter maturation of normal human fetal brain. An in vivo diffusion tensor tractography study. *Brain and Behavior*. 2012 Jul 31;1(2):95–108.
43. Dubois J, Dehaene-Lambertz G, Perrin M, Mangin J-F, Cointepas Y, Duchesnay E, et al. Asynchrony of the early maturation of white matter bundles in healthy infants: quantitative landmarks revealed noninvasively by diffusion tensor imaging. *Hum Brain Mapp*. 2007;29(1):14–27.
44. Arcangeli T, Thilaganathan B, Hooper R, Khan KS, Bhide A. Neurodevelopmental delay in small babies at term: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2012 Sep;40(3):267–75.

45. Baschat AA. Neurodevelopment following fetal growth restriction and its relationship with antepartum parameters of placental dysfunction. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2011 Apr 21;37(5):501–14.
46. 1. Barker D. Adult consequences of fetal growth restriction. *Clin Obstet Gynecol.* 2006 Jun;49(2):270–83.
47. Rees S, Inder T. Fetal and neonatal origins of altered brain development. *Early Human Development.* 2005 Sep;81(9):753–61.
48. Rousset CI, Baburamani AA, Thornton C, Hagberg H. Mitochondria and perinatal brain injury. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2012 Apr;25 Suppl 1:35–8.
49. Sun L, Macgowan CK, Sled JG, Yoo S-J, Manhiot C, Porayette P, et al. Reduced fetal cerebral oxygen consumption is associated with smaller brain size in fetuses with congenital heart disease. *Circulation.* 2015 Apr 14;131(15):1313–23.
50. Masoller N, Sanz-Cortés M, Crispi F, Gómez O, Bannasar M, Egaña-Ugrinovic G, et al. Fetal brain Doppler and biometry at mid-gestation for the early prediction of abnormal brain development at birth in congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Jun 4.
51. Golan MH, Mane R, Molczadzki G, Zuckerman M, Kaplan-Louison V, Huleihel M, et al. Impaired migration signaling in the hippocampus following prenatal hypoxia. *Neuropharmacology.* Elsevier Ltd; 2009 Oct 11;57(5-6):511–22.
52. Pugash D, Hendson G, Dunham CP, Dewar K, Money DM, Prayer D. Sonographic assessment of normal and abnormal patterns of fetal cerebral lamination. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2012 Nov 29;40(6):642–51.
53. Batalle D, Eixarch E, Figueras F, Muñoz-Moreno E, Bargalló N, Illa M, et al. Altered small-world topology of structural brain networks in infants with intrauterine growth restriction and its association with later neurodevelopmental outcome. *Neuroimage.* 2012 Apr 2;60(2):1352–66.
54. Egaña-Ugrinovic G, Sanz-Cortés M, Figueras F, Bargalló N, Gratacos E. Differences in cortical development assessed by fetal MRI in late-onset intrauterine growth restriction. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2013 Aug;209(2):126.e1–8.
55. Dubois J, Benders M, Borradori-Tolsa C, Cachia A, Lazeyras F, Ha-Vinh Leuchter R, et al. Primary cortical folding in the human newborn: an early marker of later functional development. *Brain.* 2008 Jan 10;131(8):2028–41.

## Bibliografía

56. Egaña-Ugrinovic G, Sanz-Cortés M, Couve-Pérez C, Figueras F, Gratacos E. Corpus callosum differences assessed by fetal MRI in late-onset intrauterine growth restriction and its association with neurobehavior. *Prenat Diagn.* 2014 Sep; 34(9): 843–9.
57. Sanz-Cortés M, Egaña-Ugrinovic G, Simoes RV, Vazquez L, Bargalló N, Gratacos E. Association of brain metabolism with sulcation and corpus callosum development assessed by MRI in late-onset small fetuses. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2015 Jun; 212(6): 804.e1–8.
58. Hernandez-Andrade E, Jansson T, Figueroa-Diesel H, Rangel-Nava H, Acosta-Rojas R, Gratacos E. Evaluation of fetal regional cerebral blood perfusion using power Doppler ultrasound and the estimation of fractional moving blood volume. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2007; 29(5): 556–61.
59. Hernandez-Andrade E, Figueroa-Diesel H, Jansson T, Rangel-Nava H, Gratacos E. Changes in regional fetal cerebral blood flow perfusion in relation to hemodynamic deterioration in severely growth-restricted fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2008 Jul; 32(1): 71–6.
60. Dieni S, Rees S. Dendritic morphology is altered in hippocampal neurons following prenatal compromise. *J Neurobiol.* 2003 Apr; 55(1): 41–52.
61. Baschat AA, Viscardi RM, Hussey-Gardner B, Hashmi N, Harman C. Infant neurodevelopment following fetal growth restriction: relationship with antepartum surveillance parameters. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009 Jan; 33(1): 44–50.
62. Flood K, Unterscheider J, Daly S, Geary MP, Kennelly MM, McAuliffe FM, et al. The role of brain sparing in the prediction of adverse outcomes in intrauterine growth restriction: results of the multicenter PORTO Study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2014 Sep; 211(3): 288.e1–5.
63. Cruz-Martinez R, Figueras F, Hernandez-Andrade E, Puerto B, Gratacos E. Longitudinal brain perfusion changes in near-term small-for-gestational-age fetuses as measured by spectral Doppler indices or by fractional moving blood volume. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2010 Jul; 203(1): 42.e1–6.
64. Benavides-Serralde A, Scheier M, Cruz-Martinez R, Crispi F, Figueras F, Gratacos E, et al. Changes in central and peripheral circulation in intrauterine growth-restricted fetuses at different stages of umbilical artery flow deterioration: new fetal cardiac and brain parameters. *Gynecol Obstet Invest.* 2011; 71(4): 274–80.

65. Meher S, Hernandez-Andrade E, Basheer SN, Lees C. Impact of cerebral redistribution on neurodevelopmental outcome in small for gestational age or growth restricted babies: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2015 Feb 14.
66. Spinillo A, Montanari L, Roccio M, Zanchi S, Tzialla C, Stronati M. Prognostic significance of the interaction between abnormal umbilical and middle cerebral artery Doppler velocimetry in pregnancies complicated by fetal growth restriction. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2009;88(2):159–66.
67. Nanthakomon T, Uerpairojkit B. Outcome of small-for-gestational-age fetuses according to umbilical artery Doppler: is there any yield from additional middle cerebral artery Doppler? *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2010 Aug;23(8):900–5.
68. Habek D, Jugović D, Hodek B, Herman R, Maticević A, Habek JC, et al. Fetal biophysical profile and cerebro-umbilical ratio in assessment of brain damage in growth restricted fetuses. *European Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2004 May 10;114(1):29–34.
69. Rep A, Ganzevoort W, van Wassenaer AG, Bonsel GJ, Wolf H, De Vries JIP, et al. One-year infant outcome in women with early-onset hypertensive disorders of pregnancy. *BJOG.* 2008 Jan;115(2):290–8.
70. Oros D, Figueras F, Cruz-Martinez R, Padilla N, Meler E, Hernandez-Andrade E, et al. Middle versus anterior cerebral artery Doppler for the prediction of perinatal outcome and neonatal neurobehavior in term small-for-gestational-age fetuses with normal umbilical artery Doppler. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2010 Apr;35(4):456–61.
71. Cruz-Martinez R, Figueras F, Oros D, Padilla N, Meler E, Hernandez-Andrade E, et al. Cerebral blood perfusion and neurobehavioral performance in full-term small-for-gestational-age fetuses. *American Journal of Obstetrics and Gynecology.* 2009 Nov;201(5):474.e1–7.
72. Murray E, Fernandes M, Fazel M, Kennedy SH, Villar J, Stein A. Differential effect of intrauterine growth restriction on childhood neurodevelopment: a systematic review. *BJOG* 2015 May 19;122(8):1062–72.
73. Rees S, Harding R, Walker D. The biological basis of injury and neuroprotection in the fetal and neonatal brain. *Int J Dev Neurosci.* 2011 Oct;29(6):551–63.
74. Komitova M, Xenos D, Salmaso N, May Tran K, Brand T, Schwartz ML, et al. Hypoxia-Induced Developmental Delays of Inhibitory Interneurons Are Reversed by Environmental Enrichment in the Postnatal Mouse Forebrain. *Journal of Neuroscience.* 2013 Aug 14;33(33):13375–87.

## Bibliografía

75. Lu A, Tang Y, Ran R, Clark JF, Aronow BJ, Sharp FR. Genomics of the Periinfarction Cortex After Focal Cerebral Ischemia. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. 2003 Jul;:786–810.
76. Thompson LP, Al-Hasan Y. Impact of Oxidative Stress in Fetal Programming. *J Pregnancy*. 2012;2012(8):1–8.
77. Kumral A, Tuzun F, Yesilirmak D, Duman N, Ozkan H. Role of epigenetic regulatory mechanisms in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Medical Hypotheses*. Elsevier Ltd; 2009 Jun 1;72(6):692–3.
78. Grissom NM, Reyes TM. Gestational overgrowth and undergrowth affect neurodevelopment: similarities and differences from behavior to epigenetics. *Int J Dev Neurosci*. 2013 Oct;31(6):406–14.
79. Kumral A, Tuzun F, Tugyan K, Ozbal S, Yilmaz O, Yesilirmak CD, et al. Role of epigenetic regulatory mechanisms in neonatal hypoxic-ischemic brain injury. *Early Human Development*. 2013 Mar;89(3):165–73.
80. Lee R, Kermani P, Teng KK, Hempstead BL. Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins. *Science*. 2001 Nov 30;294(5548):1945–8.
81. Binder DK, Scharfman HE. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors*. 2004 Sep;22(3):123–31.
82. Xiao J, Wong AW, Willingham MM, van den Buuse M, Kilpatrick TJ, Murray SS. Brain-derived neurotrophic factor promotes central nervous system myelination via a direct effect upon oligodendrocytes. *Neurosignals*. 2010;18(3):186–202.
83. Ringstedt T, Linnarsson S, Wagner J, Lendahl U, Kokaia Z, Arenas E, et al. BDNF regulates reelin expression and Cajal-Retzius cell development in the cerebral cortex. *Neuron*. 1998;21(2):305–15.
84. Duda DG, Jain RK. Pleiotropy of tissue-specific growth factors: from neurons to vessels via the bone marrow. *J Clin Invest*. 2005 Mar;115(3):596–8.
85. Ramos-Cejudo J, Gutiérrez-Fernández M, Otero-Ortega L, Rodríguez-Frutos B, Fuentes B, Vallejo-Cremades MT, et al. Brain-derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in subcortical ischemic stroke. *Stroke*. 2015 Jan;46(1):221–8.
86. Leal G, Afonso PM, Salazar IL, Duarte CB. Regulation of hippocampal synaptic plasticity by BDNF. *Brain Research*. Elsevier; 2014 Nov 20;:1–20.
87. Katoh-Semba R, Asano T, Ueda H, Morishita R, Takeuchi IK, Inaguma Y, et al. Riluzole enhances expression of brain-derived neurotrophic factor

with consequent proliferation of granule precursor cells in the rat hippocampus. *FASEB J.* 2002 Aug;16(10):1328–30.

88. Burkhalter J, Fiumelli H, Allaman I, Chatton J-Y, Martin J-L. Brain-derived neurotrophic factor stimulates energy metabolism in developing cortical neurons. *Journal of Neuroscience.* 2003 Sep 10;23(23):8212–20.

89. Donovan MJ, Lin MI, Wiegand P, Ringstedt T, Kraemer R, Hahn R, et al. Brain derived neurotrophic factor is an endothelial cell survival factor required for intramyocardial vessel stabilization. *Development.* 2000 Nov;127(21):4531–40.

90. Hong J-H, Park H-M, Byun KH, Lee BH, Kang WC, Jeong G-B. BDNF expression of macrophages and angiogenesis after myocardial infarction. *International Journal of Cardiology.* 2014 Oct;176(3):1405–8.

91. Bachnas MA, Mose JC, Effendi JS, Andonotopo W. Influence of antenatal magnesium sulfate application on cord blood levels of brain-derived neurotrophic factor in premature infants. *Journal of Perinatal Medicine.* 2014 Jan;42(1):129–34.

92. Rao R, Mashburn CB, Mao J, Wadhwa N, SMITH GM, Desai NS. Brain-derived neurotrophic factor in infants. *Pediatric Research.* 2009 May;65(5):548–52.

93. Gilmore J. Maternal infection regulates BDNF and NGF expression in fetal and neonatal brain and maternal–fetal unit of the rat. *Journal of Neuroimmunology.* 2003 May;138(1-2):49–55.

94. Miyazaki K. Serum neurotrophin concentrations in autism and mental retardation: a pilot study. *Brain and Development.* 2004 Aug;26(5):292–5.

95. Chouthai NS, Sampers J, Desai N, Smith GM. Changes in Neurotrophin Levels in Umbilical Cord Blood From Infants With Different Gestational Ages and Clinical Conditions. *Pediatric Research.* 2003 Jun;53(6):965–9.

96. Frotscher M. Role for Reelin in stabilizing cortical architecture. *Trends in Neurosciences.* 2010 Sep;33(9):407–14.

97. Suárez-Solá ML, González-Delgado FJ, Pueyo-Morlans M, Medina-Bolívar OC, Hernández-Acosta NC, González-Gómez M, et al. Neurons in the white matter of the adult human neocortex. *Front Neuroanat.* 2009;3:7.

98. Currustin SM, Cao A, Stewart WB, Zhang H, Madri JA, Morrow JS, et al. Disrupted synaptic development in the hypoxic newborn brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Nov 26;99(24):15729–34.

99. Pujadas L, Gruart A, Bosch C, Delgado L, Teixeira CM, Rossi D, et al. Reelin Regulates Postnatal Neurogenesis and Enhances Spine Hypertrophy

## Bibliografía

and Long-Term Potentiation. *The Journal of Neuroscience*. 2010 Jan 31;30(13):4636–49.

100. Ghiani CA, Mattan NS, Nobuta H, Malvar JS, Boles J, Ross MG, et al. Early effects of lipopolysaccharide-induced inflammation on foetal brain development in rat. *ASN NEURO*. 2011 Oct 13;3(4):233–45.

101. Rojas J. Corticogénesis y neurodegeneración: implicaciones de la vía de la reelina en la patogenia de la enfermedad de Alzheimer. *Arch Neurocién (Mex)*.2009;14(2):132-41

102. Fatemi SH, Kroll JL, Strydom JM. Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *Neuroreport*. 2001 Oct 29;12(15):3209–15.

103. Courtès S, Vernerey J, Pujadas L, Magalon K, Cremer H, Soriano E, et al. Reelin controls progenitor cell migration in the healthy and pathological adult mouse brain. *PLoS ONE*. 2011;6(5):e20430.

104. Perez-Costas E, Fenton EY, Caruncho HJ. Reelin expression in brain endothelial cells: an electron microscopy study. *BMC Neurosci*. 2015 Mar 24;16(1):719.

105. Smalheiser NR, Costa E, Guidotti A, Impagnatiello F, Auta J, Lacor P, et al. Expression of reelin in adult mammalian blood, liver, pituitary pars intermedia, and adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. The National Academy of Sciences; 2000 Jan 1;97(3):1281–6.

106. Förster E, Bock HH, Herz J, Chai X, Frotscher M, Zhao S. Emerging topics in Reelin function. *Eur J Neurosci*. 2010 May;31(9):1511–8.

107. Fatemi SH. *Reelin Glycoprotein: Structure, biology and roles in health and disease*. 2008 ed. Springer, editor. Minnesota: Springer; 2008.

108. Fatemi SH, Strydom JM, Egan EA. Reduced blood levels of reelin as a vulnerability factor in pathophysiology of autistic disorder. *Cell Mol Neurobiol*. 2002 Apr;22(2):139–52.

109. Fatemi S, Snow A, Strydom J, Araghiniknam M, Reutiman T, Lee S, et al. Reelin signaling is impaired in autism. *Biological Psychiatry*. 2005 Apr 1;57(7):777–87.

110. Ignatova N, Sindic CJM, Goffinet AM. Characterization of the various forms of the Reelin protein in the cerebrospinal fluid of normal subjects and in neurological diseases. *Neurobiol Dis*. 2004 Mar;15(2):326–30.

111. Fatemi SH, Kroll JL, Strydom JM. Altered levels of Reelin and its isoforms in schizophrenia and mood disorders. *Neuroreport*. 2001 Oct 29;12(15):3209–15.

112. Impagnatiello F, Guidotti AR, Pesold C, Dwivedi Y, Caruncho H, Pisu MG, et al. A decrease of reelin expression as a putative vulnerability factor in schizophrenia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998 Dec 22;95(26):15718–23.
113. Eastwood SL, Harrison PJ. Cellular basis of reduced cortical reelin expression in schizophrenia. *Am J Psychiatry*. 2006 Mar;163(3):540–2.
114. Guidotti A, Auta J, Davis JM, Di-Giorgi-Gerevini V, Dwivedi Y, Grayson DR, et al. Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch Gen Psychiatry*. 2000 Nov;57(11):1061–9.
115. Torrey EF, Barci BM, Webster MJ, Bartko JJ, Meador-Woodruff JH, Knable MB. Neurochemical markers for schizophrenia, bipolar disorder, and major depression in postmortem brains. *Biological Psychiatry*. 2005 Feb 1;57(3):252–60.
116. Figueras F, Meler E, Iraola A, Eixarch E, Coll O, Figueras J, et al. Customized birthweight standards for a Spanish population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2008 Jan;136(1):20–4.
117. Arduini D, Rizzo G. Normal values of Pulsatility Index from fetal vessels: a cross-sectional study on 1556 healthy fetuses. *Journal of Perinatal Medicine*. 1990;18(3):165–72.
118. Papile LA, Burstein J, Burstein R, Koffler H. Incidence and evolution of subependymal and intraventricular hemorrhage: a study of infants with birth weights less than 1,500 gm. *The Journal of Pediatrics*. 1978 Apr;92(4):529–34.
119. Lugli G, Krueger JM, Davis JM, Persico AM, Keller F, Smalheiser NR. Methodological factors influencing measurement and processing of plasma reelin in humans. *BMC Biochem*. 2003 Sep 7;4:9.
120. Ramos-Moreno T, Galazo MJ, Porrero C, Martínez-Cerdeño V, Clascá F. Extracellular matrix molecules and synaptic plasticity: immunomapping of intracellular and secreted Reelin in the adult rat brain. *Eur J Neurosci*. 2006 Jan;23(2):401–22.
121. Royston P, Wright EM. How to construct “normal ranges” for fetal variables. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1998 Jan;11(1):30–8.
122. Doménech JM y Navarro JB. Regresión logística binaria, multinomial, de Poisson y binomial negativa. 6ª ed. Barcelona: Signo; 2011
123. Mikolajczyk RT, Zhang J, Betran AP, Souza JP, Mori R, Gülmezoglu AM, et al. A global reference for fetal-weight and birthweight percentiles. *Lancet*. 2011 May 28;377(9780):1855–61.

## Bibliografía

124. Ray JG, Sgro M, Mamdani MM, Glazier RH, Bocking A, Hilliard R, et al. Birth weight curves tailored to maternal world region. *J Obstet Gynaecol Can* . 2012 Feb 16; 34(2):159–71.
125. Hanley GE, Janssen PA. Ethnicity-specific birthweight distributions improve identification of term newborns at risk for short-term morbidity. *YMOB*. Elsevier Inc; 2013 Nov 1; 209(5):428.e1–428.e6.
126. Gardosi J, Mongelli M, Wilcox M, Chang A. An adjustable fetal weight standard. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 1995 Sep; 6(3):168–74.
127. Villar J, Cheikh Ismail L, Victora CG, Ohuma EO, Bertino E, Altman DG, et al. Articles International standards for newborn weight, length, and head circumference by gestational age and sex: the Newborn Cross-Sectional Study of the INTERGROWTH-21. *Lancet*. 2014 Sep 6; 384(9946):857–68.
128. Papageorgiou AT, Ohuma EO, Altman DG, Todros T, Cheikh Ismail L, Lambert A, et al. International standards for fetal growth based on serial ultrasound measurements: the Fetal Growth Longitudinal Study of the INTERGROWTH-21st Project. *Lancet*. 2014 Sep 6; 384(9946):869–79.
129. Gardosi J. Correspondence. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*. Elsevier Ltd; 2014 Sep 26; 2(10):773–4.
130. Iraola A, González I, Eixarch E, Meler E, Illa M, Gardosi J, et al. Prediction of adverse perinatal outcome at term in small-for-gestational age fetuses: comparison of growth velocity vs. customized assessment. *Journal of Perinatal Medicine*. 36(6).
131. Östlund I, Haglund B, Hanson U. Gestational diabetes and preeclampsia. *European Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2004 Mar; 113(1):12–6
132. Geyl C, Clouqueur E, Lambert J, Subtil D, Debarge V, Deruelle P. [Links between preeclampsia and intrauterine growth restriction]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2014 Apr; 42(4):229–33.
133. Duckitt K. Risk factors for pre-eclampsia at antenatal booking: systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2005 Mar 12; 330(7491):565–0.
134. Saccone G, Berghella V. Antibiotic prophylaxis for term or near-term premature rupture of membranes: metaanalysis of randomized trials. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2015 May; 212(5):627.e1–9.
135. Cruz-Martinez R, Figueras F, Hernandez-Andrade E, Oros D, Gratacos E. Fetal Brain Doppler to Predict Cesarean Delivery for Nonreassuring Fetal

- Status in Term Small-for-Gestational-Age Fetuses. *Obstetrics & Gynecology*. 2011 Mar;117(3):618–26.
136. Li H, Gudmundsson S, Olofsson P. Prospect for vaginal delivery of growth restricted fetuses with abnormal umbilical artery blood flow. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2003 Sep;82(9):828–33.
137. Spinillo A, Capuzzo E, Nicola S, Colonna L, Iasci A, Zara C. Interaction between fetal gender and risk factors for fetal growth retardation. *YMOB*. 1994 Nov;171(5):1273–7.
138. Radulescu L, Ferechide D, Popa F. The importance of fetal gender in intrauterine growth restriction. *J Med Life*. 2013 Mar 15;6(1):38–9.
139. Simchen MJ, Weisz B, Zilberberg E, Morag I, Weissmann-Brenner A, Sivan E, et al. Male disadvantage for neonatal complications of term infants, especially in small-for-gestational age neonates. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2014 May;27(8):839–43.
140. Heuchan AM, Evans N, Henderson Smart DJ, Simpson JM. Perinatal risk factors for major intraventricular haemorrhage in the Australian and New Zealand Neonatal Network, 1995-97. *Archives of Disease in Childhood - Fetal and Neonatal Edition*. 2002 Mar;86(2):F86–90.
141. Chandrasekaran S, Srinivas SK. Antenatal corticosteroid administration: understanding its use as an obstetric quality metric. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2014 Feb;210(2):143.e1–7.
142. Alsafadi TRM, Hashmi SM, Youssef HA, Suliman AK, Abbas HM, Albaloushi MH. Polycythemia in neonatal intensive care unit, risk factors, symptoms, pattern, and management controversy. *J Clin Neonatol*. 2014 Apr;3(2):93–8.
143. Walka MM, Sonntag J, Kage A, Dudenhausen JW, Obladen M. Complete Blood Counts from Umbilical Cords of Healthy Term Newborns by Two Automated Cytometers. *Acta Haematologica*. 1998;100(4):167–73.
144. Lorenz L, Peter A, Poets CF, Franz AR. A Review of Cord Blood Concentrations of Iron Status Parameters to Define Reference Ranges for Preterm Infants. *Neonatology*. 2013;104(3):194–202.
145. Noguera NI, Detarsio G, Pérez SM, Bragós IM, Lanza O, Rodríguez JH, et al. Hematologic study of newborn umbilical cord blood. *Medicina (B Aires)*. 1999;59(5 Pt 1):446–8.
146. Dallman, P. R., and W. C. Mentzer. "Anemia." *Rudolph's Pediatrics*. Rudolph AM, Hoffman JIE, Rudolph CD, editors. 20th ed. Stamford, CT, Appleton & Lange (1996): 1172-1176.

## Bibliografía

147. Matoba N, Yu Y, Mestan K, Pearson C, Ortiz K, Porta N, et al. Differential Patterns of 27 Cord Blood Immune Biomarkers Across Gestational Age. *Pediatrics*. 2009 Apr 27;123(5):1320–8.
148. Marx CE, Vance BJ, Jarskog LF, Chescheir NC, Gilmore JH. Nerve growth factor, brain-derived neurotrophic factor, and neurotrophin-3 levels in human amniotic fluid. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. Elsevier; 1999 Nov;181(5):1225–30.
149. Malamitsi-Puchner A, Economou E, Rigopoulou O, Boutsikou T. Perinatal changes of brain-derived neurotrophic factor in pre- and fullterm neonates. *Early Human Development*. 2004 Jan;76(1):17–22.
150. Schumacher U, Mollgård K. The multidrug-resistance P-glycoprotein (Pgp, MDR1) is an early marker of blood-brain barrier development in the microvessels of the developing human brain. *Histochem Cell Biol*. 1997 Aug;108(2):179–82.
151. Saunders NR, Liddelow SA, Dziegielewska KM. Barrier mechanisms in the developing brain. *Front Pharmacol*. 2012;3:46.
152. Kadhim H, Tabarki B, Verellen G, De Prez C, Rona AM, Sébire G. Inflammatory cytokines in the pathogenesis of periventricular leukomalacia. *Neurology*. 2001 May 22;56(10):1278–84.
153. Romero R, Gotsch F, Pineles B, Kusanovic JP. Inflammation in pregnancy: its roles in reproductive physiology, obstetrical complications, and fetal injury. *Nutr Rev*. 2007 Dec;65(12 Pt 2):S194–202.
154. Malamitsi-Puchner A, Economou E, Rigopoulou O, Boutsikou T. Perinatal changes of brain-derived neurotrophic factor in pre- and fullterm neonates. *Early Human Development* . 2004 Jan;76(1):17–22.
155. Malamitsi-Puchner A, Nikolau KE, Puchner K-P. Intrauterine Growth Restriction, Brain-Sparing Effect, and Neurotrophins. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006 Dec 1;1092(1):293–6.
156. Wang C-F, Ye L-Y. [Relationship between brain-derived neurotrophic factor and birth weight in neonates]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2008 Feb;10(1):70–2.
157. Kumar P, Venners SA, Fu L, Pearson C, Ortiz K, Wang X. Association of antenatal steroid use with cord blood immune biomarkers in preterm births. *Early Human Development*. 2011 Aug;87(8):559–64.
158. Matoba N, Ouyang F, Mestan KKL, Porta NFM, Pearson CM, Ortiz KM, et al. Cord blood immune biomarkers in small for gestational age births. *J Devel Orig Health Dis*. 2011 Jan 27;2(02):89–98.

159. Fukami E, Nakayama A, Sasaki J, Mimura S, Mori N, Watanabe K. Underexpression of neural cell adhesion molecule and neurotrophic factors in rat brain following thromboxane A<sub>2</sub>-induced intrauterine growth retardation. *Early Human Development*. 2000 May;58(2):101–10.
160. Numakawa T, Matsumoto T, Ooshima Y, Chiba S, Furuta M, Izumi A, et al. Impairments in brain-derived neurotrophic factor-induced glutamate release in cultured cortical neurons derived from rats with intrauterine growth retardation: possible involvement of suppression of TrkB/phospholipase C- $\gamma$  activation. *Neurochem Res*. 2014 Apr;39(4):785–92.
161. Klein AB, Williamson R, Santini MA, Clemmensen C, Ettrup A, Rios M, et al. Blood BDNF concentrations reflect brain-tissue BDNF levels across species. *Int J Neuropsychopharm*. 2010 Jul 7;14(03):347–53.
162. Hernandez-Diaz S, Toh S, Cnattingius S. Risk of pre-eclampsia in first and subsequent pregnancies: prospective cohort study. *BMJ*. 2009 Jun 18;338(jun18 1):b2255–5.
163. Figueras F, Savchev S, Triunfo S, Crovetto F, Gratacos E. An integrated model with classification criteria to predict small-for-gestational-age fetuses at risk of adverse perinatal outcome. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Jan 27;45(3):279–85.
164. Malamitsi-Puchner A, Nikolaou KE, Economou E, Boutsikou M, Boutsikou T, Kyriakakou M, et al. Intrauterine growth restriction and circulating neurotrophin levels at term. *Early Human Development*. 2007 Jul;83(7):465–9.
165. Aslam HM, Saleem S, Afzal R, Iqbal U, Saleem SM, Shaikh MWA, et al. "Risk factors of birth asphyxia". *Ital J Pediatr*. 2014;40:94.
166. Australian Resuscitation Council, New Zealand Resuscitation Council. Planning for neonatal resuscitation and identification of the newborn infant at risk. ARC and NZRC Guideline 2010. *Emergency medicine Australasia* : EMA. 2011. pp. 424–5.
167. Ballabh P. Pathogenesis and Prevention of Intraventricular Hemorrhage. *Clinics in Perinatology*. 2014 Mar;41(1):47–67.
168. Sui L, Li B-M. Effects of perinatal hypothyroidism on regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat hippocampus: Role of DNA methylation and histone acetylation. *Steroids*. 2010 Dec;75(12):988–97.
169. Scharfman HE, MacLusky NJ. Estrogen and brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in hippocampus: complexity of steroid hormone-growth

## Bibliografía

factor interactions in the adult CNS. *Front Neuroendocrinol.* 2006 Dec;27(4):415–35.

170. Lee SK, McMillan DD, Ohlsson A, Pendray M, Synnes A, Whyte R, et al. Variations in practice and outcomes in the Canadian NICU network: 1996-1997. *Pediatrics.* 2000 Nov;106(5):1070–9.

171. Alvarez-Dolado M, Ruiz M, del Río JA, Alcántara S, Burgaya F, Sheldon M, et al. Thyroid hormone regulates reelin and dab1 expression during brain development. *Journal of Neuroscience.* 1999 Aug 15;19(16):6979–93.

172. Zhang L, Zhai X, Liu Y, Li J, Shan Z, Teng W. Treatment with Iodine in Pregnant Rats with Marginal Iodine Deficiency Improves Cell Migration in the Developing Brain of the Progeny. *Mol Neurobiol.* 2015 May 12.

173. Skorput AGJ, Yeh HH. Effects of ethanol exposure in utero on Cajal-Retzius cells in the developing cortex. *Alcohol Clin Exp Res.* 2015 Apr 6;39(5):853–62.

174. Rideau Batista Novais A, Guiramand J, Cohen-Solal C, Crouzin N, de Jesus Ferreira MC, Vignes M, et al. N-acetyl-cysteine prevents pyramidal cell disarray and reelin-immunoreactive neuron deficiency in CA3 after prenatal immune challenge in rats. *Pediatric Research.* 2013 Mar 11;73(6):750–5.

175. Fatemi SH, Emamian ES, Kist D, Sidwell RW, Nakajima K, Akhter P, et al. Defective corticogenesis and reduction in Reelin immunoreactivity in cortex and hippocampus of prenatally infected neonatal mice. *Mol Psychiatry.* 1999 Mar;4(2):145–54.

176. Folsom TD, Fatemi SH. The involvement of Reelin in neurodevelopmental disorders. *Neuropharmacology.* 2013 May;68:122–35.

177. Botella-López A, Burgaya F, Gavín R, García-Ayllón MS, Gómez-Tortosa E, Peña-Casanova J, et al. Reelin expression and glycosylation patterns are altered in Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006 Apr 4;103(14):5573–8.

178. Brummelte S, Galea LAM, Devlin AM, Oberlander TF. Antidepressant use during pregnancy and serotonin transporter genotype (SLC6A4) affect newborn serum reelin levels. *Dev Psychobiol.* 2013 Jul;55(5):518–29.

179. Li Y, Gonzalez P, Zhang L. Fetal stress and programming of hypoxic/ischemic-sensitive phenotype in the neonatal brain: Mechanisms and possible interventions. *Progress in Neurobiology.* 2012 Aug;98(2):145–65.

180. Ohishi T, Wang L, Ogawa B, Fujisawa K, Taniai E, Hayashi H, et al. No effect of sustained systemic growth retardation on the distribution of Reelin-expressing interneurons in the neuron-producing hippocampal dentate gyrus in rats. *Reprod Toxicol*. 2010 Dec;30(4):591–9.
181. Turan OM, Turan S, Gungor S, Berg C, Moyano D, Gembruch U, et al. Progression of Doppler abnormalities in intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Aug;32(2):160–7.
182. Oros D, Figueras F, Cruz-Martinez R, Meler E, Munmany M, Gratacos E. Longitudinal changes in uterine, umbilical and fetal cerebral Doppler indices in late-onset small-for-gestational age fetuses. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2011 Feb;37(2):191–5.
183. Story L, Damodaram MS, Allsop JM, McGuinness A, Patel A, Wylezinska M, et al. Brain metabolism in fetal intrauterine growth restriction: a proton magnetic resonance spectroscopy study. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 2011 Nov;205(5):483.e1–8.
184. Sanz-Cortés M, Carbajo RJ, Crispi F, Figueras F, Pineda-Lucena A, Gratacos E. Metabolomic Profile of Umbilical Cord Blood Plasma from Early and Late Intrauterine Growth Restricted (IUGR) Neonates with and without Signs of Brain Vasodilation. *PLoS ONE*. 2013;8(12):e80121.
185. Mueller GP. Multivariate analysis of traumatic brain injury: development of an assessment score. 2015 Apr 8;:1–11.
186. Zhang Y, Pardridge WM. Blood-brain barrier targeting of BDNF improves motor function in rats with middle cerebral artery occlusion. *Brain Research*. 2006 Sep 21;1111(1):227–9.
187. Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab*. 2014 Feb;25(2):89–98.
188. Hristova MG. Metabolic syndrome – From the neurotrophic hypothesis to a theory. *Medical Hypotheses*. 2013 Oct;81(4):627–34.
189. Morales-Roselló J, Khalil A, Morlando M, Papageorghiou A, Bhide A, Thilaganathan B. Changes in fetal Doppler indices as a marker of failure to reach growth potential at term. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014 Mar;43(3):303–10.
190. Morales-Roselló J, Khalil A, Morlando M, Bhide A, Papageorghiou A, Thilaganathan B. Poor neonatal acid-base status in term fetuses with low cerebroplacental ratio. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Jan 5;45(2):156–61.