



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA



TESIS DOCTORAL

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA, OBSTETRICIA, GINECOLOGÍA Y
MEDICINA PREVENTIVA

IMPACTO DE LAS CARDIOPATÍAS CONGÉNITAS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

JUNIO 2017

Autora: Aina Ruiz Romero

Directores:

- Dra. Elisa Llurba Olivé,

Jefa del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau, de Barcelona. Profesora Asociada, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona

- Dra. Elena Carreras Moratonas

Jefa del Servicio de Obstetricia del Hospital de la Vall d'Hebrón de Barcelona

Dra. Elisa Llurba Olivé

Jefa del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital de la Santa Creu i de Sant Pau, de Barcelona. Profesora Asociada, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona

Dra. Elena Carreras Moratonas

Jefa del Servicio de Obstetricia del Hospital de la Vall d'Hebrón de Barcelona

HACEN CONSTAR

Que Aina Ruiz Romero ha realizado los estudios recogidos en esta tesis doctoral bajo nuestra dirección, para la obtención del grado de Doctor en Medicina, según la normativa vigente. Los estudios mencionados están en condiciones de ser defendido por la aspirante.

Elisa Llurba Olivé

Elena Carreras Moratonas

Junio 2017

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elisa Llurba, por confiar en mí en todo momento y dejarme formar parte de un proyecto tan bonito. Por haberme guiado durante la elaboración de esta tesis, transmitirme sus conocimientos, así como por su apoyo constante tanto profesional como personalmente durante todos estos años.

A la Dra. Elena Carreras, por ofrecerme la oportunidad de trabajar en este proyecto e integrarme dentro del equipo de la UMF. Por todas las cosas que he aprendido a su lado y enseñarme otra manera de hacer obstetricia.

A la Dra. Queralt Ferrer, por todas las horas, paciencia, dedicación y energía que ha invertido enseñándome ecocardiografía, por dejarme aprender a su lado, transmitirme su pasión por las cardiopatías congénitas y siempre confiar en mis capacidades.

A la Dra. Silvia Arévalo y la Dra. Carlota Rodó, por enseñarme tanto de medicina fetal, por acogerme como una más dentro del equipo y por su cariño y amistad todo este tiempo.

A la Dra. Anna Maroto, por su amistad y apoyo, por ayudarme a levantar en los momentos difíciles, entenderme y compartir mis éxitos.

A la Olga Sànchez, por ayudarme en la recogida y procesamiento de muestras, enseñarme y aportar todos sus conocimientos. Sin ella esta tesis no hubiera sido posible.

A todos los compañeros de Vall d'Hebrón, de obstetricia, cardiología pediátrica, neonatos, radiología, neurología pediátrica y anatomía patológica que han contribuido, recogiendo muestras, datos, realizando pruebas y ayudándome en la coordinación de este proyecto.

A todas las pacientes, a sus parejas y a sus bebés por formar parte de esta tesis, por su colaboración, paciencia, fuerza e ilusión; y por luchar en la investigación de las cardiopatías congénitas.

Al Dr. Albert Tubau y al Dr. Miquel Juan, por enseñarme desde cero, transmitirme su pasión por la ecografía, por confiar en mí y ayudarme a continuar mi formación en Vall d'Hebrón. Por seguir aprendiendo a su lado y acompañarme este tiempo tanto profesional como personalmente.

A todos los compañeros de Igualada, Manresa y Son Llàtzer por su apoyo durante los años de realización de estos estudios, por sus ánimos, risas y cariño.

A todos mis compañeros de residencia, por recibirme siempre con tanta ilusión en mis tan necesarias visitas a la isla, y por su apoyo y amistad incondicional. En especial a Laura por ser la mejor coR del mundo, a Albert por ser un excelente compañero de guardias, escucharme y animarme; y a Nofre por su inagotable energía y las largas horas en el archivo.

A todos los amigos que han compartido conmigo todos estos años, tanto en Barcelona como en Mallorca, por animarme, escucharme y hacer que todo sea más fácil. En especial a Albert y Noe, por estar desde siempre incondicionalmente, a Juan y Paty por entenderme y ser mi fuente de alegría, a los Andamis por las risas y hacerme sentir tan querida y a Eva, Míriam y Sílvia por ser el mejor remedio a la miseria.

A toda mi familia, los yayos, los avis, el Toni, la Gemma, la tieta, el Jordi, la Mireia, la Núria, el Jordi, la Joana y el Gerard por estar siempre, apoyarme y creer en mí.

A la Mima, por estar siempre a mi lado, darme fuerzas, animarme y ayudarme, aunque sea desde la distancia. Por venir a visitarme cuando la echo de menos y por hacer que todos los momentos juntas sean únicos.

A mis padres, por haber trabajado y luchado siempre por mí, por dárme todo y apoyarme en la realización de mis sueños. Por estar siempre que les necesito y ayudarme en este año tan difícil y siempre.

A Raúl, por cuidarme, ayudarme, entenderme y apoyarme siempre. Por darme fuerzas, acompañarme en todos mis proyectos y compartir conmigo mi vida y mis ilusiones. Sin él nada de todo esto sería posible.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1 Importancia clínica y repercusión en la salud de las cardiopatías congénitas	15
1.2 Impacto neurológico de las cardiopatía congénita.....	15
1.2.1 Desarrollo neurológico después de cirugía cardíaca	16
1.2.2 Desarrollo neurológico al nacimiento	18
1.3 Cardiopatías congénitas. Resultados perinatales y patrones de crecimiento prenatal.....	19
1.4 Retraso de crecimiento intrauterino (RCIU). Etiopatogenia	20
1.4.1 RCIU e insuficiencia placentaria	21
1.5 Placentación normal.	22
1.6 Insuficiencia placentaria.....	23
1.7 Angiogénesis, factores angiogénicos y antiangiogénicos.....	24
1.8 Relación de los factores angiogénicos con la insuficiencia placentaria (preclampsia y retraso de crecimiento).	28
1.9 Relación de los factores angiogénicos y las cardiopatías congénitas. Modelos animales	29
1.10 Relación de los factores angiogénicos y las cardiopatías congénitas. Últimos avances	31
2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO	35
3. HIPÓTESIS	41
3.1 Hipótesis principal.....	43
3.2 Hipótesis específicas	43

4. OBJETIVOS	45
4.1 Objetivo principal	47
4.2 Objetivos secundarios.....	47
5. ESTUDIOS	49
5.1 Estudio 1: Complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en gestantes portadoras de fetos con cardiopatía congénita	51
5.2 Estudio 2: Cambios longitudinales en las biometrías y la hemodinámica cerebroplacentaria en fetos con cardiopatía congénita.	51
5.3 Estudio 3: Expresión cerebral de distintos genes angiogénicos en las cardiopatías congénitas.	52
6. MÉTODOS	55
6.1 Estudio 1: Complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en gestantes portadoras de fetos con cardiopatía congénitas.....	57
6.1.1 Variables del estudio	59
6.1.2 Análisis estadístico	59
6.2 Estudio 2: Cambios longitudinales en las biometrías y la hemodinámica cerebroplacentaria en fetos con cardiopatía congénita.	60
6.2.1 Variables del estudio:	63
6.2.2 Evaluación ecográfica	63
6.2.3 Análisis estadístico	65
6.3 Estudio 3: Expresión cerebral de distintos genes angiogénicos en las cardiopatías congénitas.	65
6.3.1 Extracción y PCR en tiempo real (RT-PCR) cuantificación de mRNA.....	66
7. RESULTADOS	69
7.1 Estudio 1: Complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en gestantes portadoras de fetos con cardiopatía congénitas.....	71

7.2 Estudio 2: Cambios longitudinales en las biometrías y la hemodinámica cerebroplacentaria en fetos con cardiopatía congénita.	74
7.3 Estudio 3: Expresión cerebral de distintos genes angiogénicos en las cardiopatías congénitas.	85
8. DISCUSIÓN	89
8.1 Estudio 1: Complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en gestantes portadoras de fetos con cardiopatía congénitas.....	91
8.2 Estudio 2: Cambios longitudinales en las biometrías y la hemodinámica cerebroplacentaria en fetos con cardiopatía congénita.	94
8.3 Estudio 3: Expresión cerebral de distintos genes angiogénicos en las cardiopatías congénitas.	100
9. FUTURAS DIRECCIONES.....	109
10. CONCLUSIONES.....	115
11. BIBLIOGRAFÍA.....	119
12. ANEXO.....	135
12.1 Anexo 1: Trabajos publicados.....	137
12.1.1 Estudio 1: Complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en gestantes portadoras de fetos con cardiopatía congénitas	137
12.1.2 Estudio 2: Cambios longitudinales en las biometrías y la hemodinámica cerebroplacentaria en fetos con cardiopatía congénita.....	145
12.1.3 Estudio 3: Expresión cerebral de distintos genes angiogénicos en las cardiopatías congénitas.....	157

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia clínica y repercusión en la salud de las cardiopatías congénitas

Las cardiopatías congénitas (CC) afectan a 8 de cada 1000 recién nacidos; el registro Europeo de Malformaciones Congénitas sitúa las CC en la malformación congénita más prevalente. Anualmente en la Unión Europea nacen 36.000 niños con CC, y se estima que 3000 casos más mueren debido a la interrupción legal de la gestación, muerte intraútero o neonatal (1).

La prevalencia global de CC no cromosómicas es de 7 por cada 1.000 nacimientos, de los cuales un 3,6% fueron muertes perinatales, 20% diagnosticados prenatalmente, y 5.6% interrupciones voluntarias del embarazo. Las CC no cromosómicas severas afectan a 2,0 de cada 1.000 recién nacidos, de los cuales el 8,1% son muertes perinatales, 40% son diagnosticados prenatalmente, y 14% interrupciones de la gestación (1).

Los avances técnicos en la cirugía cardíaca, las técnicas de diagnóstico y el manejo postquirúrgico han permitido mejorar el pronóstico de estos pacientes. La supervivencia global en los niños con CC sometidos a cirugía cardíaca es del 95%. El pronóstico de las CC viene condicionado, en gran parte, por sus consecuencias en el desarrollo del sistema nervioso central (SNC). El retraso psicomotor, déficits de aprendizaje, dificultades académicas y, en definitiva, las dificultades de integración en una sociedad cada vez más exigente se convierten en las secuelas más invalidantes de este grupo de pacientes.

1.2 Impacto neurológico de la cardiopatía congénita

Hasta un 50% de los niños con CC muestran alteraciones en alguna de las áreas del neurodesarrollo (2), estas incluyen un amplio espectro de déficits neurológicos subsecuentes, incluyendo alteraciones motoras, cognitivas,

conductuales, sociales y de atención. La mayoría de estudios que han evaluado las alteraciones neurológicas en los niños con CC se han centrado en los factores asociados a la cirugía reparadora (3)(4)(5)(6).

1.2.1 Desarrollo neurológico después de cirugía cardíaca

La morbilidad neurológica después de la reparación de las cardiopatías congénitas (CC) en la infancia es bien conocida, en particular se asocia a complicaciones derivadas de la circulación extracorpórea hipotérmica y el paro circulatorio hipotérmico profundo, realizados durante la cirugía, estos conllevan una reducción del suministro de O₂ y por lo tanto un defecto de perfusión cerebral durante la intervención (4), que consecuentemente puede dar lugar a lesiones neurológicas.

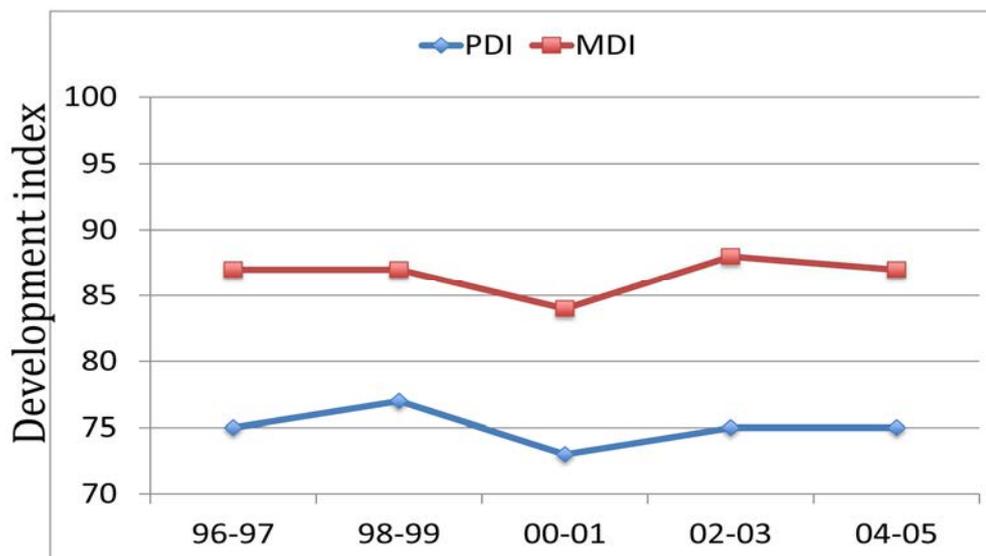
No obstante, a pesar de las grandes mejoras llevadas a cabo en las últimas 2 décadas para disminuir las secuelas neurológicas relacionadas con la cirugía cardíaca y los grandes esfuerzos para identificar los factores de riesgo asociados a la cirugía, el porcentaje de alteraciones en el desarrollo neurológico de estos niños no es nada desdeñable. Los factores de riesgo asociados con la cirugía y conocidos actualmente explican sólo ~30% de las alteraciones observadas en el desarrollo neurológico de estos niños (7).

En un estudio llevado a cabo en 2015 (8), en el que se evaluaron más de 1700 niños afectados de CC, la cohorte más amplia evaluada hasta la fecha, se estudió el desarrollo neurológico entre los 6 y 30 meses tras cirugía cardíaca abierta, entre 1996 y 2009. Se evaluó el Índice de Desarrollo Psicomotor (PDI) y un Índice de Desarrollo Mental (MDI). Los resultados mostraron que el 63.5% y el 36.1% los niños sometidos a cirugía cardíaca presentan un PDI y un MDI, respectivamente, más de una desviación estándar por debajo de la población normal. Mientras que el 36.8% y el 15.3%, presentan un PDI y un MDI más de 2 desviaciones estándar por debajo la población normal. Este mismo estudio mostraba como estos resultados eran independientes del año de nacimiento, como muestra la **Figura 1**.

Los factores que contribuyeron desfavorablemente a estos resultados son el bajo peso al nacer, la poca educación materna, sexo masculino, presencia de anomalías genéticas y/o extracardíacas.

Los autores concluían que a pesar de la mejoría de las técnicas quirúrgicas y el soporte post-quirúrgico, el nivel de desarrollo neurológico ha mejorado de forma muy modesta y no significativa a lo largo de los años. Postulan varias explicaciones para estos hallazgos. Factores ambientales y características propias del paciente, tales como la prematuridad, la presencia síndromes genéticos y el estatus socioeconómico, pueden ser determinantes más importantes de los resultados en el desarrollo neurológico que las estrategias de manejo intraquirúrgico o los cuidados postoperatorios.

Figura 1. Índice de Desarrollo Psicomotor (PDI) e Índice de Desarrollo Mental (MDI) en niños con CC sometidos a cirugía cardíaca abierta, por año de nacimiento.



1.2.2 Desarrollo neurológico al nacimiento

Durante años se creyó que el neurodesarrollo anómalo se producía exclusivamente como resultado del daño asociado a la cirugía abierta y a los distintos procedimientos de soporte asociados, sin embargo, durante la última década se ha descrito que en una proporción relevante de casos existen signos de alteraciones del neurodesarrollo de forma pre o perinatal, antes de que se realice cualquier procedimiento quirúrgico (9)(10) (11)(12)(13).

En los últimos años se han publicado diversos estudios que muestran alteraciones neurológicas en recién nacidos con CC después del parto y antes de la cirugía cardíaca. En uno de estos estudios se realizaba una exploración neurológica completa a los recién nacidos con CC a los pocos días de vida, los resultados muestran que en más de la mitad de los casos (56%) se evidenciaron anomalías neuroconductuales y neurológicas, que incluían hipotonía, hipertonia, nerviosismo, asimetrías motoras, ausencia de succión, convulsiones, microcefalia y macrocefalia (10).

Estudios basados en pruebas de neuroimagen también han puesto de manifiesto alteraciones importantes en el SNC de manera prequirúrgica. En un estudio realizado en 2007, en el que se realizaron pruebas de resonancia magnética (RM) y espectrografía magnética nuclear (MRS) a 49 fetos con CC, se evidenciaron alteraciones en la difusión cerebral y en 13 (32%) casos lesiones en la sustancia blanca, hallazgos similares a los encontrados en neonatos prematuros y que pueden ser reflejo de un desarrollo cerebral anormal intraútero (11).

Estudios más recientes han relacionado esta alteración neurológica con el patrón de oxigenación cerebral dependiendo del tipo de CC. Un estudio llevado a cabo en 58 fetos con CC, pone de manifiesto que todos los fetos con CC muestran diferencias significativas en las biometrías cefálicas, la perfusión cerebral, el desarrollo cortical y el metabolismo cerebral en comparación con

fetos controles; y que estos cambios son más pronunciados en los fetos afectados de CC que se asocian a una reducción en el suministro de sangre oxigenada al cerebro (14), apoyando la hipótesis de que, durante la vida fetal, la morfología anormal del corazón altera el flujo sanguíneo dando como resultado el suministro de sangre desaturada al cerebro, causando cierto grado de hipoxia cerebral.

1.3 Cardiopatías congénitas. Resultados perinatales y patrones de crecimiento prenatal.

Varios estudios han analizado el crecimiento uterino de los fetos con CC. El precursor y principal de todos ellos, el Baltimore Washington Infant Study, apuntó que los recién nacidos con CC tienen un peso al nacimiento menor, y esta diferencia se mantenía tras ajustar los datos por factores de confusión maternos y fetales (15).

Un estudio posterior basado en la misma población, estudió los patrones de crecimiento según el tipo de CC; observó que los recién nacidos con transposición de grandes arterias tenían un peso normal al nacer, pero un volumen cefálico menor en relación con el peso al nacimiento. Mientras que los recién nacidos con tetralogía de Fallot presentaban todas las biometrías de menor tamaño, pero de manera simétrica. Los recién nacidos con corazón izquierdo hipoplásico, en cambio, a pesar de presentar todas sus biometrías menores, tenían un volumen cefálico desproporcionadamente pequeño en comparación con el resto de biometrías. Estos hallazgos sugieren que los distintos patrones de circulación fetal, derivados del tipo de CC, pueden condicionar patrones anormales de crecimiento fetal (16).

Estudios posteriores se han llevado a cabo, siguiendo esta línea, reportando hasta un 25% de recién nacidos con un peso al nacimiento por debajo del percentil 10 (pequeños para la edad gestacional)(17) .

1.4 Retraso de crecimiento intrauterino (RCIU). Etiopatogenia

El retraso de crecimiento intrauterino (RCIU), es el término utilizado para describir un feto que no ha alcanzado su potencial de crecimiento debido a factores genéticos o ambientales (18).

Tradicionalmente, se ha definido el RCIU como un peso fetal por debajo del percentil 10 peso para la edad gestacional (19) (20). Actualmente se tienen también en cuenta parámetros Doppler (21)(22), de tal manera que en la práctica clínica se reserva el término RCIU para aquellos fetos con un peso estimado por ecografía por debajo del percentil 10 asociado a un Índice de pulsatilidad (IP) del Doppler de la arteria umbilical por encima del percentil 95 para la edad gestacional y aquellos con peso por debajo del percentil 3 independientemente de las características Doppler. Reservando el término pequeño para la edad gestacional (PEG) para aquellos fetos cuyo crecimiento se encuentran entre el percentil 3 y el 10 con Doppler normal.

Se han descrito diversas causas para el desarrollo de RCIU, de origen materno, placentario y fetal (23)(24)(25)(26).

1. Causa Fetal (27)

- Anomalías genéticas (5-20%): donde se incluye aneuploidías (incluyendo triploidías), disomía uniparental, mutaciones de un solo gen, deleciones o duplicaciones parciales.
- Infecciones fetales (5-10%): Citomegalovirus y toxoplasma son las infecciones más frecuentes en nuestro medio.
- Anomalías estructurales fetales
- Gestación múltiple

2. Causa materna

- Factores genéticos maternos
- Edades maternas extremas

- Enfermedades maternas: tales como Diabetes, enfermedades autoinmunes, enfermedad cardiovascular, enfermedad renal o hipertensión crónica.
- Tóxicos: alcohol, drogas, tabaco, fármacos
- Técnicas de reproducción asistida
- Bajo peso materno, escasa ganancia ponderal durante la gestación, malnutrición.
- Periodo intergenésico corto

3. Causa Placentaria

- Insuficiencia útero-placentaria (causa más frecuente, aproximadamente 30% del total de casos).

4. Causa idiopática: fetos constitucionalmente pequeños y/o de causa desconocida.

Hoy en día se postula que la mayoría de los RCIU verdaderos son de causa placentaria y que su origen puede tener lugar de forma precoz en la gestación (28).

1.4.1 RCIU e insuficiencia placentaria

El crecimiento fetal normal depende del potencial de crecimiento genéticamente determinado y es modulado por factores maternos, fetales, placentarios y extrínsecos (29). El RCIU supone un fracaso en alcanzar dicho potencial. El diagnóstico de dicha entidad se puede sospechar clínicamente, pero su confirmación se realiza mediante la ecografía prenatal, así como su seguimiento. Una vez establecido el diagnóstico de RCIU es necesario establecer un adecuado manejo fetal y materno con una estrecha monitorización del bienestar fetal.

En los RCIU secundarios a insuficiencia placentaria, la restricción de crecimiento intrauterino es debida a un inadecuado aporte de oxígeno y nutrientes, como consecuencia de una insuficiencia útero-placentaria (28).

1.5 Placentación normal.

En la gestación normal, se producen una serie de cambios vasculares, que son claves para la correcta formación placentaria. Gran parte de estos cambios, se dan a nivel de las arterias especiales maternas del lecho placentario. Estas presentan una serie de cambios fisiológicos, que serán claves para la correcta formación placentaria. Las paredes de dichas arterias contienen una capa elástica de tejido muscular similar a la de otras arterias de del organismo y, por lo tanto son vasoactivas. El embarazo requiere un aporte sanguíneo hasta en 10 veces mayor, para que esto sea posible las arterias espirales deben transformarse en vasos de baja resistencia. Estos cambios vasculares fisiológicos tienen lugar gracias a la interacción entre el trofoblasto y los tejidos maternos.

El proceso tiene lugar en dos fases: la primera entre las semanas 6-12 de gestación y la segunda entre las semanas 16-20 de gestación. En la primera fase (figura 2) las células del trofoblasto alcanzan las arterias espirales maternas, y penetran en su luz, formando acúmulos intraluminales, que son básicos las primeras semanas de gestación, ya que regulan el aporte de oxígeno al embrión. En una segunda fase, las células del trofoblasto reemplazan las células endoteliales de las arterias espirales e invaden la capa media del vaso, destruyendo el tejido elástico, muscular y nervioso de esta capa vascular. Las células del trofoblasto se incorporan en la pared vascular hasta alcanzar el espesor del miometrio (Figura 3).

Este proceso de invasión trofoblástica, resulta en una transformación de las arterias espirales maternas, de vasos de pequeño calibre (alta resistencia) a vasos de alto calibre (baja resistencia) capaces de proporcionar perfusión placentaria adecuada para sostener el crecimiento fetal (30) (31)(32).

Figura 2. Invasión del trofoblasto en las arterias espirales maternas

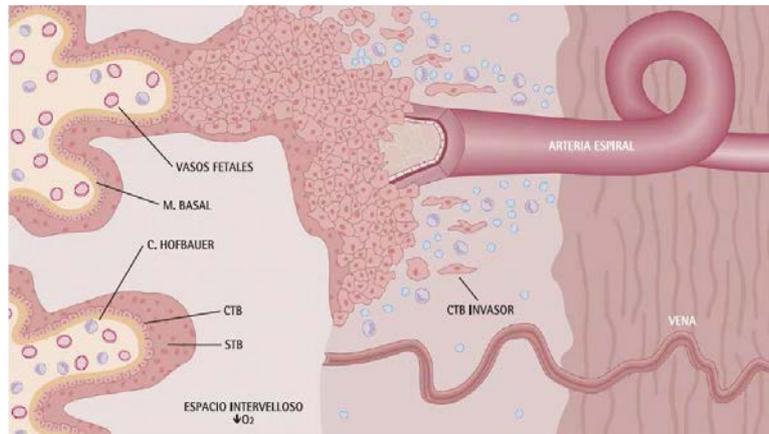
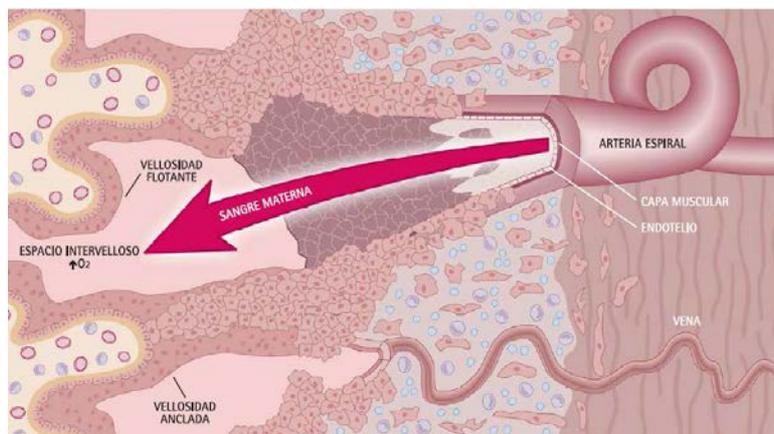


Figura 3. Segunda fase de la invasión del trofoblasto en las arterias espirales maternas. El trofoblasto reemplaza las células endoteliales e invade la capa media del vaso, destruyendo el tejido elástico, muscular y nervioso de esta capa vascular. Las células del trofoblasto se incorporan en la pared vascular hasta alcanzar el espesor del miometrio

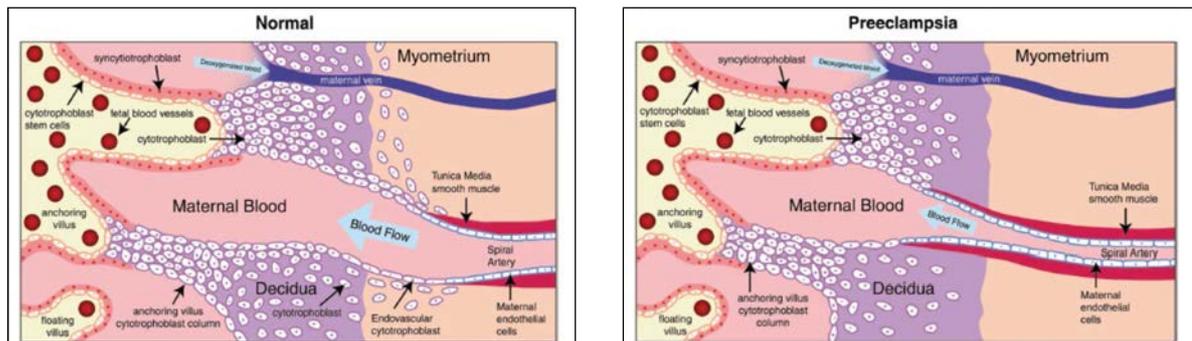


1.6 Insuficiencia placentaria.

Una deficiente invasión trofoblástica de las arterias espirales en el primero y principios del segundo trimestre parece estar en el origen de la alteración de la circulación uteroplacentaria. La primera invasión del trofoblasto tan solo alcanza uno o dos tercios de la capa de la decidua y la conversión de la capa muscular de estos vasos no se consiguen. Consecuentemente la

segunda invasión trofoblástica no se produce o es mínima. Esto da lugar a una perfusión placentaria anómala, que es restrictiva, hecho que se hace más patente a medida que avanza la gestación y la demanda del feto aumenta (Figura 4).

Figura 4. Placentación normal y placentación anómala (30)



Este hecho no solo se da en casos de RCIU, sino que la preclamsia, el óbito fetal y el desprendimiento de placenta, también son manifestaciones de la insuficiencia placentaria.

Se ha demostrado que en la preclamsia, los citotrofoblastos no adoptan un fenotipo endotelial invasivo. Por esa razón, la invasión de las arterias espirales es poco profunda y siguen siendo vasos de pequeño calibre, con alta resistencia (30).

Esta placenta anómala, responde a la hipoperfusión produciendo factores que son liberados a la circulación materna y fetal pudiendo causar alteraciones sistémicas en la función celular endotelial (30)(33)(34)(32)(31)(35). Las alteraciones del desarrollo placentario se han asociado a alteraciones en los niveles de determinados factores angiogénicos.

1.7 Angiogénesis, factores angiogénicos y antiangiogénicos

La angiogénesis es el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de capilares preexistentes. Es un fenómeno fisiológico

durante la embriogénesis, el crecimiento del organismo y la cicatrización (36) (37). Sin embargo también juega un papel fundamental en procesos patológicos como el crecimiento tumoral o la formación de metástasis (38) (39). El proceso de placentación normal requiere también de un proceso de angiogénesis.

La angiogénesis es un proceso complejo que comprende varias etapas, incluyendo la migración y la proliferación de las células endoteliales (36) (40).

La regulación de la angiogénesis se lleva a cabo mediante un perfecto equilibrio entre la producción y la liberación de diversos factores estimulantes (factores angiogénicos) e inhibidores (factores anti-angiogénicos), que varían en función de las necesidades y el tipo de tejido. Un número elevado de enfermedades se caracteriza por alteraciones del proceso angiogénico, tanto por insuficiencia como por exceso de angiogénesis.

Normalmente, en la mayoría de tejidos existe un predominio de factores antiangiogénicos, bloqueando de esta manera el crecimiento. Delante determinadas situaciones o insultos, como la hipoxia, se desencadenan una serie de procesos que estimulan la formación de factores angiogénicos e inhiben los antiangiogénicos, promoviendo así la formación de nuevos vasos.

Entre los principales actores angiogénicos se encuentra el vascular endotelial growth factor (VEGF).

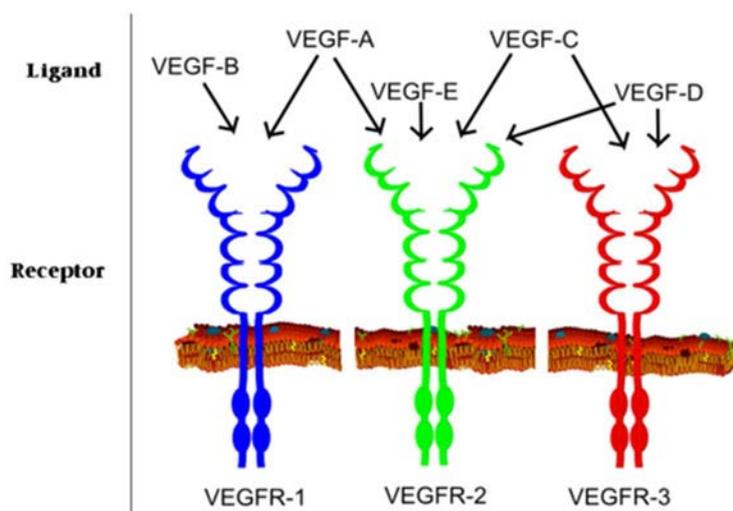
El Vascular endotelial growth factor (VEGF), también llamado Vascular permeability factor (VPF), es una proteína dimérica aislada en distintos tipos celulares, tiene una función angiogénica, actuando directamente en las células endoteliales promoviendo su división, crecimiento y migración. También es un potente vasodilatador, incrementando la permeabilidad de los capilares a diferentes tipos de macromoléculas (41) (42). El término de VEGF incluye a varias proteínas entre las que se encuentran el VEGF-A y el Placental growth factor (PIGF) (43), las funciones de cada una de estas proteínas se encuentra resumida en la **tabla 1**.

Tabla 1. Función de distintos tipos de VEGF

Tipo	Función
VEGF-A	<ul style="list-style-type: none">• Angiogénesis<ul style="list-style-type: none">- Migración células endoteliales- Mitosis de células endoteliales- Creación de la luz de los vasos sanguíneos- Creación de fenestraciones de los vasos• Quimiotáctico para macrófagos y granulocitos• Vasodilatación
PlGF	<ul style="list-style-type: none">• Importante para la vasculogénesis• También necesario en isquemia, inflamación, cicatrización y cáncer.

Los miembros de la familia VEGF realizan su función en las células diana a través de tres receptores localizados en las células endoteliales y otros tipos celulares: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3 (44). VEGF-A se une a VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (KDR/Flk-1) (**Figura 5**) (45).

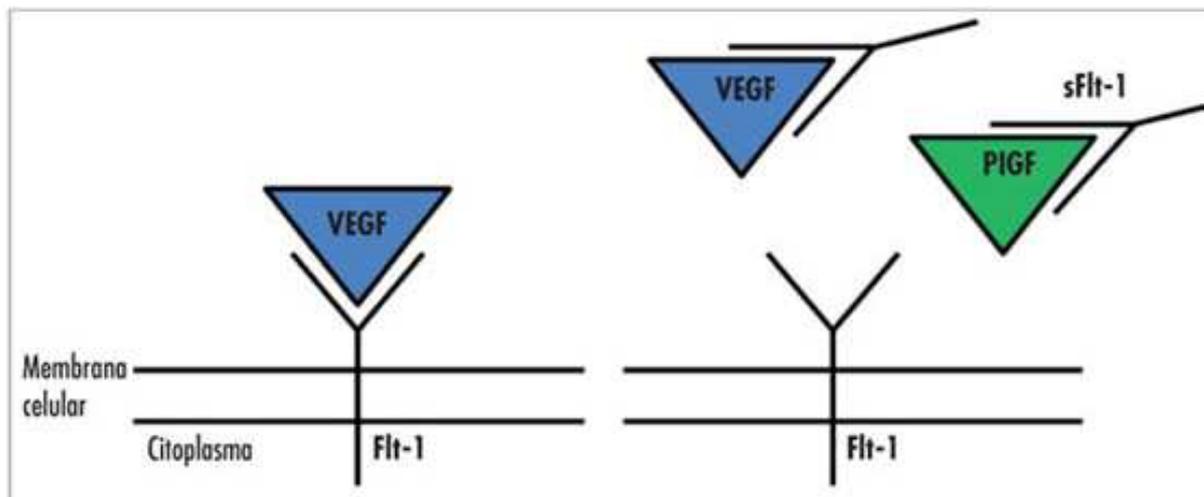
Figura 5. VEGF y su unión a los distintos receptores



La unión de VEGF-A y PlGF a VEGFR-1 conduce a la proliferación celular, migración y aumento de la permeabilidad celular dando como resultado la vasculogénesis y la angiogénesis; la unión de VEGF-A a VEGFR-1, activa también estos dos procesos, además de la linfangiogénesis embrionaria (44).

El mRNA pre-mensajero de VEGF-1, puede dar lugar mediante un splicing alternativo al Soluble fms-like Tyrosine Kinase 1 (sFlt-1), una proteína soluble sin dominio citoplasmático, que actúa como un potente antagonista del VEGF y del PlGF, ya que se une a éstas proteínas y de esta forma evita la interacción de dichas proteínas con sus receptores (**Figura 6**) (46)

Figura 6. En el esquema de la izquierda se puede observar la unión normal de VEGF a su receptor VEGF-1 o Flt-1. En el esquema de la derecha se representa como el factor antiangiogénico sFlt-1 se une a VEGF i PlGF, impidiendo así su unión al receptor.



La producción de VEGF puede inducirse en células que no están recibiendo suficiente oxígeno. En casos de hipoxia se desencadena una serie de procesos que estimulan la liberación de VEGF, que se une a los receptores de VEGF en las células endoteliales, desencadenando así una vía que conduce a la angiogénesis.

1.8 Relación de los factores angiogénicos con la insuficiencia placentaria (preclamsia y retraso de crecimiento).

El proceso de placentación normal requiere un proceso de angiogénesis fisiológico, en el que juegan un papel importante diferentes factores angiogénicos, entre ellos, los más destacables VEGF, PlGF y sFlt-1.

Existe una amplia evidencia de que en gestaciones con insuficiencia placentaria existe un desequilibrio en la expresión de estos factores, así como de sus receptores (47) (48).

Como ya hemos comentado Las principales manifestaciones de la insuficiencia placentaria son la preclamsia (PE) y el retraso de crecimiento intrauterino (RCIU). La preclamsia (PE) es un cuadro clínico específico del embarazo, que cursa principalmente con hipertensión y proteinuria, a parte de otras afectaciones sistémicas y se manifiesta más allá de las 20 semanas de gestación.

En la actualidad, hay evidencia que sugiere que el síndrome materno que acompaña a la preclamsia es secundario a una placentación anómala y que dicha alteración en la invasión del trofoblasto condiciona una hipoxia que secundariamente produce un exceso de la expresión placentaria de sFlt-1 y, aunque sin estar aún del todo claro si el aumento de sFlt-1 es causa o consecuencia de la alteración de la invasión del citotrofoblasto en las arterias espirales maternas. En todo caso jugaría un papel fundamental en la etiopatogenia de la enfermedad placentaria empeorando la situación de hipoxia (49).

Se ha observado un aumento de los niveles de sFlt-1 circulantes en suero de pacientes con preclamsia, asociado a un descenso de los niveles de VEGF y PlGF, y que este desequilibrio en la síntesis placentaria de los factores angiogénicos parece afectar también al endotelio materno contribuyendo al desarrollo de la PE (50).

La Soluble endoglin (sEng), otra proteína antiangiogénica circulante que inhibe la unión del VEGF a sus receptores, actúa junto con sFlt1 induciendo

hipertensión, proteinuria y lesión glomerular, típicas lesiones de la PE, en ratas (50). Además se ha demostrado que los niveles de sEng en suero, se incrementan semanas antes de la aparición de la PE en gestantes, este aumento se acompaña de un incremento en el ratio de sFlt-1/PLGF, y sus niveles se relacionan con la severidad del cuadro (51). Estas mismas alteraciones se han observado en casos de RCIU (52) (53).

Las alteraciones en los factores pro y antiangiogénicos, en los casos de PE y RCIU están presentes ya en el primer trimestre de la gestación, permitiendo la detección de estas pacientes de riesgo (54) antes de que se presente clínicamente la enfermedad.

Estudios recientes indican que el ratio sFlt-1/PIGF es el marcador más útil para el diagnóstico de preclamsia (55)(56) y lo que es más importante, determina las pacientes con mayor riesgo de resultados maternos o fetales adversos (57). El incremento en los niveles de suero de sFlt-1 y la reducción en los niveles de PIGF, los cuales provocan un aumento en el ratio sFlt-1/PIGF, pueden detectarse en la segunda mitad del embarazo en mujeres con riesgo a desarrollar complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria, cuyos diagnósticos no solo incluyen la PE, sino también RCIU o muerte fetal (53).

1.9 Relación de los factores angiogénicos y las cardiopatías congénitas.

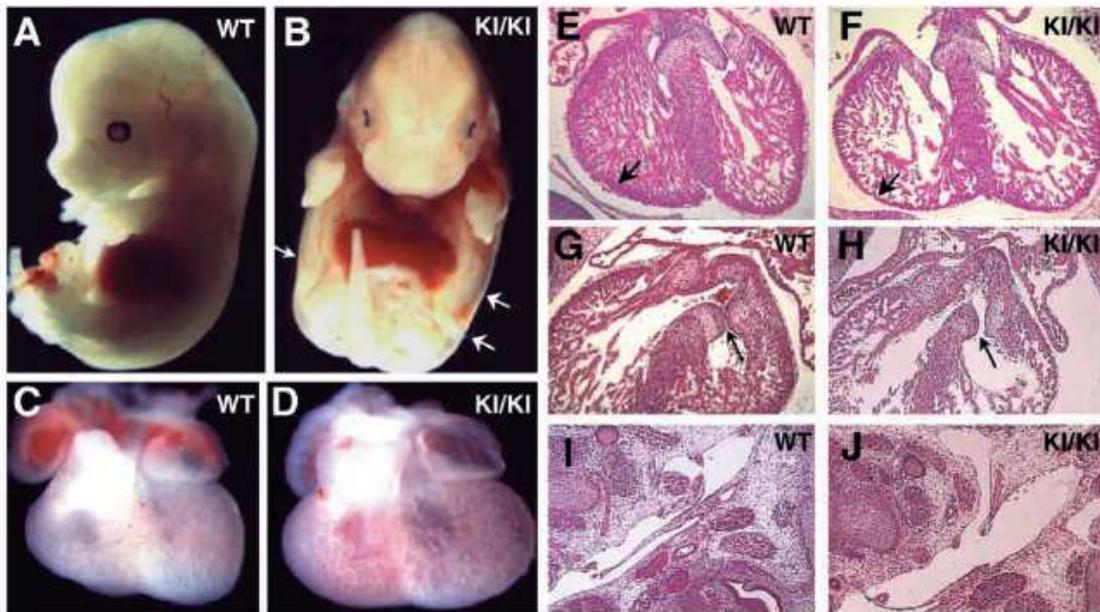
Modelos animales

Existen evidencias de modelos animales, de la implicación de los factores angiogénicos en la formación cardíaca.

Estudios realizados con embriones de ratón mutados para el gen de VEGF-A, demostraron una disfunción cardiovascular, causante de la muerte de estos a los 9 días. Los embriones presentaban en heterocigosis un alelo inactivado del gen VEGF-A, dando como resultados un 50% en la expresión de este factor angiogénico, que resultó en una formación vascular anómala letal (58).

Posteriormente se demostró la importancia de la correcta expresión de VEGF-A para la correcta morfogénesis cardíaca. En un estudio en embriones de ratón mutados se observó que la sobreexpresión de VEGF-A da como resultado severas alteraciones en la formación cardíaca, que resultan en la muerte de estos embriones a los 12-14 días. Los embriones mutantes mostraban una compactación anómala del miocardio, sobreproducción de trabéculas, y una septación ventricular defectuosa, a de más de anomalías en la remodelación del tracto de salida del ventrículo izquierdo (**Figura 7**) (59).

Figura 7. WT: embrión no mutado KI/KI: embrión mutado. Se puede observar como el embrión KI/KI (B), está hidrópico y con un corazón hipertrófico (C) en comparación con el WT (A) (D); (E y F) sección de corazón de embrión KI/KI, las flechas señalan una trabeculación menor en comparación con el del embrión WT (G y H) Las flechas señalan un defecto del septo ventricular en el embrión KI/KI.



En un estudio con embriones de pez cebra se observó que al bloquear selectivamente el receptor de VEGF a las 17-42 horas después de la fecundación resulta en defectos funcionales y estructurales a nivel de la

formación de las válvulas cardíacas, señalando así un papel importante de los receptores de VEGF en la formación valvular cardíaca (60).

Estos estudios y otros realizados en la misma línea (61) (62) sugieren que la señalización de VEGF desempeña un papel crítico a lo largo de todo el proceso de formación cardíaca y que sus niveles deben estar estrictamente regulados para la correcta morfogènesis cardíaca (63).

1.10 Relación de los factores angiogénicos y las cardiopatías congénitas. Últimos avances

Estudios recientes llevados a cabo por nuestro grupo, demostraron que en gestantes portadoras de un feto con una CC, los niveles en suero de PIGF a las 11-13 semanas están disminuidos, sugiriendo una alteración a nivel de la angiogènesis placentaria. Está alteración se observó en caso de defectos conotruncales y valvulares, pero no en casos de obstrucciones de salida del ventrículo izquierdo (LVTO) o Síndrome de hipoplasia del ventrículo izquierdo (64).

Siguiendo esta línea estudiamos los niveles de factores pro y anti-angiogénicos entre las 18 y las 37 semanas en el suero de gestantes portadoras de un feto con CC, encontrando al igual que en el estudio anterior un descenso de los niveles de PIGF y un aumento de los de sFlt-1, en casos de defectos conotruncales y valvulares, no así en los casos de LVTO; en un segundo tiempo analizamos los valores de sFlt-1 en sangre de cordón en recién nacidos con CC, resultando también elevados y reafirmando una posible alteración intrínseca de la angiogènesis que conduce a la formación anormal del corazón de estos fetos y que probablemente también está presente en las células trofoblásticas (65).

En este mismo estudio investigamos la expresión de distintos factores angiogénicos así como marcadores de hipoxia tisular en tejido cardíaco de fetos procedentes de interrupciones de la gestación por CC y se compararon con controles, observando un aumento significativo en los niveles de VEGF-A y

sFlt-1 en los fetos con CC, y mostrando así la primera evidencia de un proceso angiogénico anormal en tejido cardíaco fetal humano.

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

2. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

En estudios previos realizados en gestaciones afectas de CC, nuestro grupo relacionó por primera vez la presencia de un desbalance angiogénico en las mujeres con un feto afecto de cardiopatía congénita. Observamos valores disminuidos de PIGF en suero materno a las 11-13 (64) y a las 18-37 semanas de gestación (66), así como valores aumentados de sFlt-1, lo que indica que la placenta en casos de feto afecto de CC presentaban una alteración de la angiogénesis. Esta conclusión derivó a preguntarnos dos hipótesis, en primer lugar si estas pacientes, en consecuencia presentaban mayor riesgo de complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria y en segundo lugar los efectos de dicho ambiente anti-angiogénico a nivel fetal, tanto en lo que se refiere al crecimiento fetal como en lo referente al mayor riesgo de neurodesarrollo anómalo que presentan estos niños.

Es por todo ello, que nuestro grupo, y especialmente una de las directoras de esta tesis, la Dra. Llurba, con una amplia experiencia investigadora en el campo de las complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria, nos propusimos evaluar la posible relación entre las CC y la insuficiencia placentaria, lo que llevó a la realización del primer estudio de esta tesis.

A partir de los resultados de este estudio, en el que se determina una mayor incidencia de complicaciones relacionadas con la insuficiencia placentaria, tales como la PE y el RCIU, en las gestaciones con fetos afectados de CC; quisimos evaluar qué papel juega la placenta en los cambios biométricos de los fetos con CC tanto a nivel cerebral como corporal, así como determinar si existe un deterioro en estas biometrías durante toda la gestación y si estos cambios están relacionados con los distintos tipos de oxigenación cerebral en las distintas CC.

Además, en este segundo estudio planteamos confirmar la presencia de unas biometrías cefálicas más pequeñas en estos casos ya que actualmente, y

gracias a los avances técnicos en la cirugía cardíaca, las técnicas de diagnóstico y el manejo postquirúrgico han permitido mejorar el pronóstico de estos pacientes, pero sin embargo, no se ha conseguido disminuir el riesgo de desarrollar complicaciones neurológicas a medio y/o a largo plazo. Hasta un 50% de los niños con CC muestran alteraciones en alguna de las áreas del neurodesarrollo (2). La mayoría de estudios que han evaluado las alteraciones neurológicas en los niños con CC se han centrado en los factores asociados a la cirugía reparadora (3). Durante años se creyó que el neurodesarrollo anómalo se producía como resultado del daño asociado a la cirugía abierta y procedimientos de soporte asociados, sin embargo, recientemente se ha descrito que en una proporción relevante de casos existen signos de alteraciones del neurodesarrollo de forma pre o perinatal, antes de que se realice cualquier procedimiento quirúrgico (9) (10).

A pesar de la importancia y la frecuencia de estas complicaciones, así como de la evidencia acumulada sobre la relación de las CC con neurodesarrollo anómalo, no se conoce las causas por las que se produce esta lesión ni los factores de riesgo que determinan mayor repercusión en el neurodesarrollo, campo en el que desde hace años está trabajando nuestro grupo. Por tanto en este segundo estudio, queríamos responder a la pregunta de si la presencia de unas biometrías cefálicas más pequeñas al nacimiento o en el tercer trimestre reportadas por otros grupos (67) estaba ya presente en el segundo trimestre y también como evolucionaba a lo largo de la gestación para determinar mejor que condicionantes determinan su aparición, como tipos de cardiopatía y su relación con los parámetros de evaluación Doppler cerebral y placentarios.

Por último, teniendo en cuenta estudios anteriores, en los que habíamos estudiado la expresión de distintos factores angiogénicos, anti-angiogénicos y distintos marcadores de hipoxia en tejido cardíaco de fetos con CC (66), encontrando un desbalance antiangiogénico en este tejido, que apuntaba a un desbalance angiogénico intrínseco que podía haber contribuido a la patogénesis de la malformación, quisimos estudiar si esta disregulación se produce también

en las vías angiogénicas implicadas en el desarrollo vascular cerebral, pudiendo así causar un mayor riesgo de lesión neurológica en estos fetos.

3. HIPÓTESIS

3. HIPÓTESIS

3.1 Hipótesis principal

La hipótesis de nuestro estudio es que, en los fetos con cardiopatía congénita, existe desregulación de las vías relacionadas con la angiogénesis que afectaría diversos sistemas como la placenta y el sistema nervioso central. A nivel placentario condicionaría cierto grado de insuficiencia placentaria que daría lugar a un mayor riesgo de preclamsia materna y restricción de crecimiento fetal. Y a nivel neurológico, la presencia de una alteración del desarrollo vascular y del aporte de oxígeno cerebral muy precoz que contribuiría al mayor riesgo neurológico que presentan estos niños.

3.2 Hipótesis específicas

1. Las mujeres embarazadas que llevan un feto con CC tienen un mayor riesgo de presentar complicaciones secundarias a insuficiencia placentaria, tales como PE, eclampsia, síndrome HELLP, muerte fetal intraútero y RCIU.
2. Existen cambios en los parámetros biométricos y Doppler placentario y cerebrales en los fetos con CC de forma precoz.
3. En las CC se produce una desregulación en las vías de angiogénesis implicadas en el desarrollo cerebral que pueden determinar un mayor riesgo de deterioro neurológico.

4. OBJETIVOS

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo principal

Profundizar en la relación entre la existencia de un cierto grado de insuficiencia placentaria y las complicaciones perinatales y del desarrollo en los fetos con cardiopatía congénita.

4.2 Objetivos secundarios

1. Describir las complicaciones secundarias a insuficiencia placentaria presentes en las gestaciones con fetos con CC.
2. Evaluar la relación entre el desarrollo cefálico durante el período fetal y la insuficiencia placentaria según el grado de oxigenación cerebral determinado por el tipo de CC.
3. Estudiar la expresión de distintos factores angiogénicos y antiangiogénicos y de hipoxia crónica en dos áreas distintas de tejido cerebral (lóbulo frontal y ganglios basales) de fetos humanos euploides con y sin CC.

5. ESTUDIOS

5. ESTUDIOS

Esta tesis es el resumen de tres trabajos realizados siguiendo una misma línea de trabajo en relación al papel de los factores angiogénicos en el desarrollo neurológico de los fetos de CC. En este capítulo se enumeran los tres trabajos, así como su estado de publicación.

5.1 Estudio 1: Complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en gestantes portadoras de fetos con cardiopatía congénita (Anexo 1)

Aina Ruiz, Queralt Ferrer, Olga Sánchez, Irene Ribera, Silvia Arévalo, Onofre Alomar, Manel Mendoza, Lluís Cabero, Elena Carreras, Elisa Llurba
J Matern-Fetal Neonatal 2016 Oct; 29 (20):3271–5
Doi: 10.3109/14767058.2015.1121480

Estado: Publicado

Factor de impacto: 1.674

5.2 Estudio 2: Cambios longitudinales en las biometrías y la hemodinámica cerebroplacentaria en fetos con cardiopatía congénita. (Anexo 2)

Ruiz A, Cruz-Lemini M, Masoller N, Sanz-Cortés M, Ferrer Q, Ribera I, Martínez JM, Crispí F, Arévalo S, Gómez O, Pérez-Hoyos S, Carreras E, Gratacós, Llurba E.
Ultrasound Obstet Gynecol 2016 May 23.
Doi: 10.1002/uog.15970.

Estado: Publicado

Factor de impacto: 4.254

5.3 Estudio 3: Expresión cerebral de distintos genes angiogénicos en las cardiopatías congénitas.

(Anexo 3)

Olga Sánchez, Aina Ruiz-Romero, MD; Carmen Domínguez, Queralt Ferrer, Irene Ribera, Jaume Alijotas, Silvia Arévalo, Lluís Cabero, Elena Carrerras, Elisa Llurba

Estado: pendiente de aceptación.

6. MÉTODOS

6. MÉTODOS

6.1 Estudio 1: Complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en gestantes portadoras de fetos con cardiopatía congénitas

Se realizó un estudio de cohortes retrospectivo en gestaciones consecutivas con CC en la Unidad de Medicina Fetal del Hospital Universitario de Vall d'Hebron, entre diciembre de 2003 y diciembre de 2014. Sólo los fetos con CC severas se incluyeron en el estudio, y se clasificaron en 3 grupos (66):

1. Defectos valvulares aurículo-ventriculares: defectos del septo interventricular, defectos del septo aurículo-ventricular, anomalías de Ebstein y atresia tricuspídea.
2. Anomalías conotruncales: Transposición de grandes arterias, tetralogía de Fallot y ventrículo derecho de doble salida.
3. Obstrucciones de salida del ventrículo izquierdo (LVOT): Estenosis de la válvula Aórtica, Coartación de Aorta, Sd. Shone e hipoplasia de ventrículo izquierdo.

La distribución en función del grupo se encuentra resumida en la **tabla 2**.

Las anomalías cardíacas no estructurales tales como tumores o arritmias, los defectos cardíacos leves y las anomalías del sistema venoso fueron excluidos.

Los resultados perinatales de las gestantes con un feto afecto de CC fueron comparados con mujeres con los de 6025 gestantes de bajo riesgos, seguidas en nuestro centro entre 2012 y 2013.

Tabla 2. Clasificación y distribución de los casos en los 3 grupos de CC

	n
1. Defectos valvulares aurículo-ventriculares	104
Defectos septales	36
Defectos del septo aurículo-ventricular	19
Anomalía de Ebstein	6
Atresia tricuspídea	10
Atresia pulmonar con septo ventricular íntegro	20
Transposición de grandes arterias corregida	5
Ventrículo izquierdo de doble entrada	8
2. Anomalías Conotruncuales	102
Transposición de grandes arterias	62
Tetralogía de Fallot	23
Ventrículo derecho de doble entrada	14
Tronco arterial común	2
Ventana aorto-pulmonar	1
3. Obstrucción de salida del ventrículo izquierdo (LVOT)	73
Estenosis Aórtica	3
Coartación de Aorta	43
Interrupción de arco Aórtico	1
Atresia mitral	8
Hipoplasia de ventrículo izquierdo	18

6.1.1 Variables del estudio

Se recogieron las siguientes variables:

- a. Variables demográficas: edad, peso, talla, IMC, raza, hábito tabáquico, método de concepción, paridad.
- b. Antecedentes médicos y obstétricos: Hipertensión crónica, Diabetes, preclamsia, RCIU, muerte fetal intraútero.
- c. Variables referentes a la gestación: Número de fetos, estudio genético, interrupción voluntaria de la gestación.
- d. Variables ecográficas: tipo de CC, biometrías fetales, peso fetal estimado, Índice de pulsatilidad (IP) de la arteria umbilical, IP de la arteria cerebral media, IP de las arterias uterinas.
- e. Complicaciones de la gestación: preclamsia, eclampsia, Sd. Hellp, RCIU, desprendimiento de placenta (DPPNI), muerte fetal intrauterina.
- f. Variables referentes al parto: semanas de gestación al parto, tipo de parto, peso del recién nacido, peso de la placenta.

6.1.2 Análisis estadístico

Para la comparación de las diferentes variables cualitativas y cuantitativas se utilizaron las pruebas de Chi-cuadrado (χ^2), la prueba exacta de Fisher, o la prueba U de Mann-Whitney, según conviniera. Se consideraron estadísticamente significativos valores de $P < 0,05$.

Las pruebas T-Student no pareada, U de Mann-Whitney, Kruskal-Wallis y la prueba de comparación múltiple post-test de Dunn se utilizaron para determinar las diferencias entre grupos en la tasa de preclamsia.

Con el objetivo de poder realizar una comparación independiente de la edad gestacional, los pesos fetales al nacimiento fueron normalizados utilizando Z-scores

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa *Prisma GraphPad Software* (GraphPad, versión 5.0b, San Diego, CA) y

el *Statistical Package for Social Sciences software* (SPSS 17.0; Chicago, IL).

6.2 Estudio 2: Cambios longitudinales en las biometrías y la hemodinámica cerebroplacentaria en fetos con cardiopatía congénita.

Se realizó un estudio retrospectivo de casos de fetos con CC diagnosticados en 2 centros terciarios de Barcelona: Hospital Universitari Vall d'Hebrón y BCN Natal. La población de estudio fueron mujeres embarazadas que acudieron a las unidades de cardiología fetal de los respectivos hospitales para la realización de una ecocardiografía fetal entre junio de 2010 y diciembre de 2014. Se incluyeron todas aquellas pacientes con el diagnóstico de CC mayor. Como criterios de exclusión se consideraron: embarazos con edad gestacional < 20 semanas o > 25 semanas, malformaciones extracardíacas asociadas, presencia de anomalías cromosómicas, arritmia asociada, afección materna que podría afectar la hemodinámica fetal, como la diabetes, la enfermedad de la tiroides o la preclamsia, el embarazo múltiple y la anemia fetal.

Con el fin de analizar el efecto en el desarrollo cerebral según el patrón de oxigenación dependiendo del tipo de CC, se estratificó la población de estudio en tres grupos, utilizando la misma clasificación previamente publicada (67)(14):

- Grupo 1: Bajo contenido de sangre placentaria (sangre oxigenada, rica en nutrientes), se incluyen en este grupo obstrucciones severas del tracto de salida del ventrículo izquierdo (LVOT) con flujo reverso en el istmo aórtico (y por lo tanto con una perfusión sanguínea cerebral retrógrada a través del ductus arterioso) y la transposición de grandes arterias (TGA) con el flujo sanguíneo aórtico originado en el ventrículo derecho (**Figura 8**).

- Grupo 2: Contenido intermedio de sangre placentaria y sistémica (desoxigenada, pobre en nutrientes) debido a derivaciones intracardiacas (defectos septales, defectos conotruncales distintos de la TGA y CC complejas) (**Figura 9**).
- Grupo 3: Alto contenido de sangre placentaria, se incluyen CC en las que la sangre que perfunde el cerebro proviene del ventrículo izquierdo a través de una Aorta formada correctamente, es decir CC derechas, tales como estenosis pulmonar, atresia tricúspide, anomalía de Ebstein y atresia pulmonar (**Figura 10**).

El protocolo del estudio fue aprobado por los comités de ética de ambos hospitales y se obtuvo el consentimiento por escrito de todas las gestantes que participaron en el estudio.

Figura 8 Obstrucción severa del tracto de salida del ventrículo izquierdo (LVOT) (68). Se puede observar el nulo flujo de sangre placentaria (color rojo) a través de la Aorta y como el aporte sanguíneo cerebral es mixto de sangre oxigenada (roja) y desoxigenada (azul), y se produce de manera reversa a través del istmo aórtico desde el Dúctus arterioso.

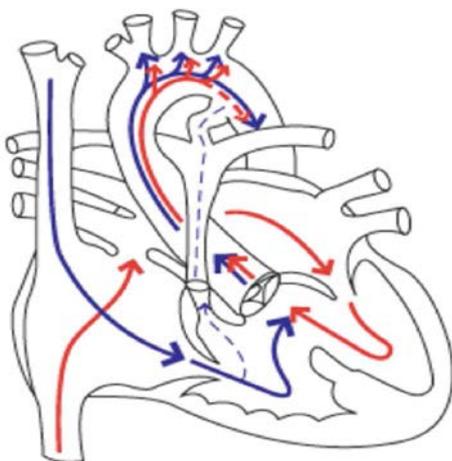


Figura 9. Tetralogía de Fallot. (68). Irrigación del cerebro a través de la Aorta, obsérvese el contenido intermedio de sangre placentaria (roja) y sistémica (azul) debido a derivaciones intracardiacas (defectos septales, defectos conotruncales distintos de la TGA y CC complejas)

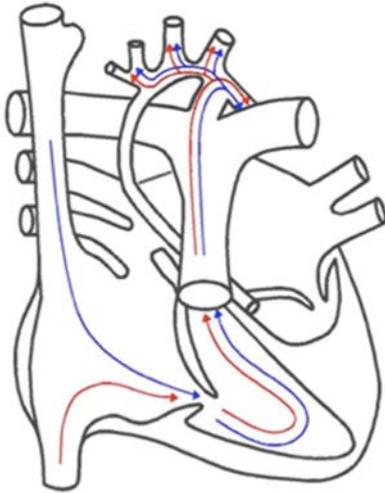
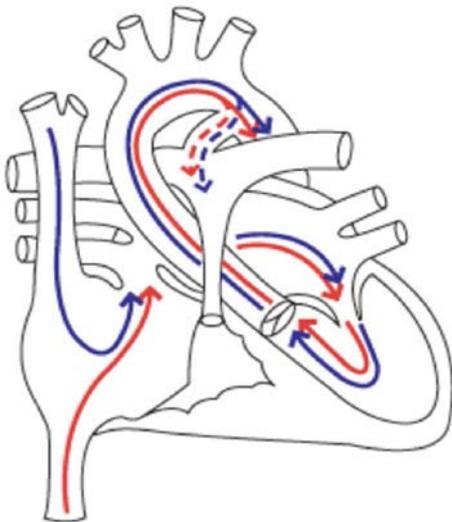


Figura 10. Atresia tricuspídea (68). La sangre que perfunde el SNC es sangre con un alto contenido de sangre placentaria, se incluyen CC en las que la sangre que perfunde el cerebro proviene del ventrículo izquierdo a través de una Aorta formada correctamente,



6.2.1 Variables del estudio:

Se recogieron las siguientes variables:

- a. Variables demográficas: edad.
- b. Variables perinatales: preclamsia, semanas de gestación al parto, tipo de parto.
- c. Variables neonatales: sexo, peso del recién nacido, percentil de peso del recién nacido, talla al nacimiento, perímetro cefálico al nacimiento, Apgar y phmetría.

La talla al nacimiento y el perímetro cefálico se convirtieron en Z-Scores (Zs), utilizando datos normalizados publicados (69).

6.2.2 Evaluación ecográfica

La edad gestacional en el momento de la exploración se calculó en base a la longitud cráneo-caudal (CRL) obtenida en la ecografía de cribado del primer (70).

Se realizó una ecografía completa en cada feto utilizando un Voluson E8 (GE Healthcare Ultrasound, Milwaukee, WI, EE.UU.) o Siemens Sonoline Antares (Siemens Medical Systems, Malvern, PA, EE.UU, ambas máquinas de ultrasonidos equipadas con un transductor curvado convexo de 9-2 MHz.

El examen ecocardiográfico se realizó de acuerdo con las guías clínicas de la International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology (71). Se evaluaron en dos dimensiones así como mediante el Doppler pulsado y el Doppler color: el eje y el situs cardíaco, la presencia de derrame pericárdico, la morfología ventricular, venoatrial, atrioventricular y las conexiones ventriculoarteriales, el tamaño y las relaciones de salida del ventrículo izquierdo y derecho, los arcos ductal y aórtico, el septo auricular e interventricular y el flujo a través de las válvulas auriculoventriculares y semilunares.

El diagnóstico prenatal de CC se confirmó en el posparto mediante una ecocardiografía o mediante la autopsia en casos de muerte neonatal.

Los parámetros biométricos fetales evaluados fueron: el diámetro biparietal (BPD), la circunferencia cefálica (HC), la circunferencia abdominal (AC) y la longitud femoral (FL), que fueron transformados en percentiles para la edad gestacional (72)(73).

El peso fetal estimado fue calculado de acuerdo con el método de Hadlock et al. (74); y tanto el peso fetal estimado como el peso al nacer fueron calculados utilizando las curvas de referencia local (75).

Todos los parámetros Doppler se evaluaron en ausencia de movimientos fetales con suspensión materna voluntaria de la respiración. Las mediciones de los parámetros de Doppler pulsado se realizaron automáticamente a partir de tres o más ondas consecutivas, con un ángulo de insonación tan cerca de 0° cómo fue posible.

Se evaluaron los siguientes parámetros Doppler:

- Índice de Pulstilidad (IP) de la Arteria umbilical (UA): su medición se realizó en un asa libre del cordón umbilical.
- IP de la Arteria cerebral media (MCA): se midió en un corte transversal del cráneo fetal a nivel de su origen en el polígono de Willis (76).
- Ratio cerebroplacentario (CPR): se calculó dividiendo el IP de la MCA por el IP de la UA (77).
- IP medio de la arteria uterina (UtA): se evaluó con la sonda colocada en el cuadrante inferior del abdomen, en un ángulo medial, se identificó mediante Doppler color su cruce con la arteria ilíaca externa. El IP medio de la UtA se calcula a partir de la media del IP de la arteria uterina derecha e izquierda (78).

Los parámetros se transformaron en Z Scores (Zs) y percentiles considerando sus rangos de normalidad (76)(77)(78).

Cuando IP MCA y / o CPR estaban por debajo del percentil 5 quinto, se interpretó como signo de vasodilatación / redistribución cerebral (77). El IP

medio de la UtA fue La PI media considerado anormal por encima del percentil 95 (78).

6.2.3 Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando los paquetes estadísticos IBM SPSS Statistics 21 y el Stata 13.1 (StataCorp College Station). Todos los parámetros se convirtieron en Zs utilizando datos normalizados publicados, a partir de una población de fetos sanos (72)(73)(76)(77)(78).

Un Zs de 0 corresponde a la media de los datos normales y los Zs de ± 1 y ± 2 están a 1 y 2 DS de la media, respectivamente. Las variables se han expresado como media \pm DS o porcentaje (n). Los índices Doppler y los parámetros biométricos se compararon entre los grupos utilizando ANOVA de un solo factor.

Para controlar los errores tipo 1 de inflación, se realizaron comparaciones post-hoc por parejas entre los grupos diagnósticos, aplicando una corrección de Bonferroni al valor p de cada test. Las variables dicotómicas se analizaron usando la χ^2 y la prueba exacta de Fisher, y se consideró estadísticamente significativa una $p < 0.05$.

Para el análisis de mediciones repetidas se utilizó un modelo mixto lineal, con un componente de tendencia cuadrática para la edad gestacional incluido en el efecto fijo. Se incluyó una intercepción aleatoria y una pendiente en el componente de efecto aleatorio. Las variables de los distintos grupos de CC se incluyeron en el modelo y se comprobaron para la interacción. Las predicciones de efecto fijo se representaron frente a las semanas de gestación.

6.3 Estudio 3: Expresión cerebral de distintos genes angiogénicos en las cardiopatías congénitas.

Se obtuvieron muestras de tejido cerebral de fetos afectados de CC, producto de interrupciones del embarazo. Todas las pacientes proporcionaron

su consentimiento por escrito para el almacenamiento y el uso de muestras de tejido con fines de investigación y todas las muestras se obtuvieron del Banco de Tejido Fetal del Hospital Universitario de Vall d'Hebron. Durante la autopsia, nueve regiones diferentes del cerebro fueron disecadas y almacenadas de acuerdo a un protocolo de muestreo estandarizado.

Para nuestro estudio, se seleccionaron dos regiones cerebrales: (1) corteza frontal o (2) ganglios basales e hipotálamo. Las muestras de estudio se compararon con muestras de fetos sanos, sin CC (grupo CTRL). Todas las muestras de control provienen de interrupciones terapéuticas del embarazo entre 17 y las 22 semanas de gestación en mujeres sin otra patología.

6.3.1 Extracción y PCR en tiempo real (RT-PCR) cuantificación de mRNA

El tejido cerebral fetal, de la corteza frontal o de los ganglios basales y el hipotálamo, se utilizaron para la extracción total de ARN.

Las muestras de tejido encefálico congelado se extirparon (menos de 100 mg) usando mortero y maja, sumergidas en QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) y completamente homogeneizadas (20-40 s) con un homogeneizador (ULTRA-TURRAX T 10 basic Disperser / Homogenizer, IKA Works).

El ARN total se extrajo y se trató con DNasa utilizando el tejido lipídico RNeasy® (Qiagen) de acuerdo con el protocolo del fabricante. El rendimiento e integridad de ARN se cuantificaron en un espectrofotómetro NanoDrop ND-2000 (Thermo Scientific). Se utilizó ARN (500 ng / reacción) para la síntesis de ADNc con cebadores hexámeros aleatorios (RevertAid H menos el primer kit de síntesis de cDNA de hebra, Fermentas, St. Leon-Rot, Alemania). Los ensayos de expresión génica TaqMan inventariados (**Tabla 3**) y personalizados (sFlt-1) se obtuvieron de Applied Biosystems.

Las secuencias para cebadores sFlt-1 y sonda fueron las siguientes:
 Forward, 5'-GGGAAGAAATCCTCCAGAAGAAAGA-3';
 Reverse, 5'-GAGATCCGAGAGAAAACAGCCTTT-3';
 Y sonda, 5'-AGTGCTCACCTCTGATTG-3' (79)

Los niveles de expresión de ARNm se normalizaron a los niveles de la subunidad A de ARN-polimerasa II dirigida a ADN humano (POL2A; ID de ensayo Hs00172187_m1), y se usó una muestra de control como calibrador. La expresión relativa se calculó mediante el método Ct doble delta, utilizando el software del sistema de detección de secuencias Prism 7000 (v1.2.3) de Applied Biosystems.

Tabla 3. Ensayos de expresión génica TaqMan inventariados de Applied Biosystems. HIF-1 α , Hypoxia Inducible Factor 1-alpha; HIF-2 α , Hypoxia Inducible Factor 2-alpha; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; PIGF, placental growth factor.

Gen	Ensayo TaqMan
HIF1- α	Hs00153153_m1
HIF2- α	Hs01026149_m1
VEGF-A	Hs00900055_m1
PIGF	Hs00182176_m1

6.3.2 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism (GraphPad, versión 5.0b, San Diego, CA, EE.UU.). Los resultados se presentan como media más DS. Se utilizó el test omnibus K2 de D'Agostino y Pearson para determinar la distribución normal de las variables. Cuando se asumió la normalidad, los datos se analizaron por un lado con el test no pareado de Student, y por otro lado se utilizó el test U de Mann-Whitney para las variables no paramétricas. El umbral de p-valor utilizado para las diferencias significativas fue inferior a 0,05.

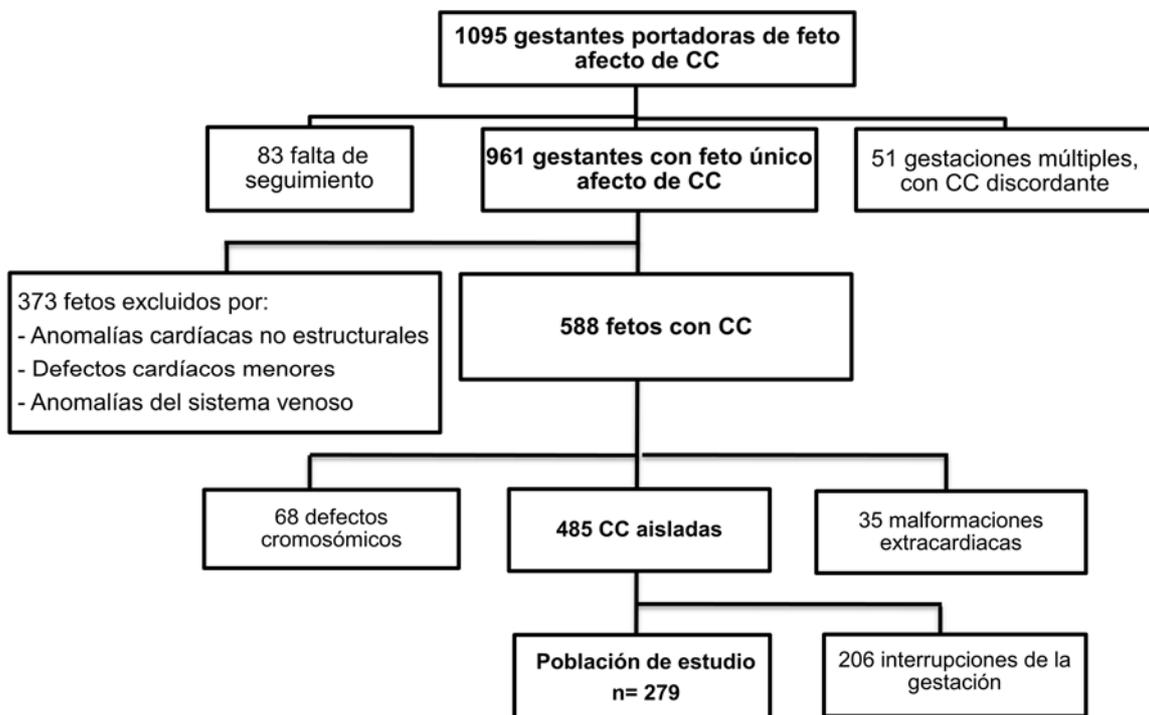
7. RESULTADOS

7. RESULTADOS

7.1 Estudio 1: Complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en gestantes portadoras de fetos con cardiopatía congénitas

Durante el período de estudio, 1095 pacientes embarazadas fueron remitidas a nuestra unidad por sospecha de CC. De estas, 83 fueron perdidas de seguimiento, 51 eran embarazos múltiples (80) y en 373 casos el feto presentaba una anomalía cardíaca distinta a las incluidas en el estudio. De los restantes 588 fetos únicos con CC estructural, 68 fueron excluidos por anomalías cromosómicas y 35 por acompañarse de malformaciones extracardíacas. En 206 casos se realizó una interrupción voluntaria de la gestación. El diagrama de flujo de los casos se muestra en la **Figura 11**.

Figura 11. Diagrama de flujo de la población de estudio. CC: cardiopatía congénita



Finalmente, se evaluaron los resultados perinatales de 279 gestaciones. Las gestantes fueron clasificadas, según el tipo de CC, en los tres grupos anteriormente descritos: 104 defectos atrioventriculares (37,3%), 102 anomalías conotruncales (36,5%) y 73 LVOT (26,2%) (**Tabla 2**). Las características maternas y los factores de riesgo para PE y RCIU se muestran en la **Tabla 4**, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

Tabla 4. Características basales de los 3 grupos de CC. A-V: Defectos valvulares atrioventriculares, LVOT: Obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo. RCIU: retraso del crecimiento intrauterino. Valores mostrados como media \pm DS o porcentajes.

Parámetros	A-V (n = 104)	Conotruncal (n = 102)	LVOT (n = 73)	Valor p
Edad (años)	30.89 (0.3)	31.2 (0.2)	29.73 (0.9)	0.43
Peso (Kg)	66.41 (2.5)	63.99 (3.2)	66.61 (3.2)	0.43
Altura (m)	1.63 (0.1)	1.73 (0.3)	1.61 (0.2)	0.35
Índice masa corporal (Kg/m2)	24.51 (0.2)	25.52 (0.3)	24.88 (0.5)	0.98
Caucásicas	86 (82.7%)	86 (84.3%)	68 (93.1%)	4.29
Fumadoras	14 (13.4%)	18 (17.6%)	10 (13.5%)	0.84
Concepción				
Espontánea	99 (95.2%)	98 (96.1%)	71 (97.3%)	0.78
Asistida	5 (4.8%)	4 (3.9%)	2 (2.7%)	
Paridad				
Nulípara	46 (44.3%)	52 (51.0%)	36 (49.3%)	0.60
Multípara	58 (55.7%)	50 (49.0%)	37 (50.7%)	
Hipertensión crónica	1 (0.9%)	1 (0.9%)	1 (1.4%)	0.76
Diabetes I/II	1 (0.9%)	2 (1.9%)	1 (1.4%)	0.83
Historia obstétrica				
Preclamsia previa	1 (0.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.43
RCIU previo	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.4%)	0.24
Muerte intraútero previa	2 (1.9%)	0 (0.0%)	2 (2.7%)	0.28

En global, sufrieron PE durante el embarazo 16 (5,7%) mujeres portadoras de un feto con CC: 8 fueron leves (50%), 6 severos (37,5%) y 2 Síndromes de HELLP (11,5%). Los porcentajes de PE según el subgrupo de CC se muestran en la **Tabla 5**. Se observó una incidencia superior de PE en el grupo de CC en comparación con la población normal (5,7% versus 1,2%, $p < 0,0001$) (OR 5,96; IC del 95%: 3,19 - 10,54).

También se encontraron diferencias significativas entre el subgrupo de defectos valvulares auriculoventriculares y defectos conotruncales con respecto a la población normal (7,7% versus 1,2%; $P < 0.0001$) y (5,8% versus 1,2%, $p = 0.0003$), respectivamente. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el grupo de LVOT y la población normal (2,7% versus 1,2%; $P = 0,254$), ni entre los diferentes grupos de CC (7,7% versus 5,8% versus 2,7%; $P = 0,376$).

Con respecto al percentil de peso al nacer, los fetos con CC presentan un peso al nacer significativamente menor que la población normal; el 21,1% y el 9,7% de los fetos con CC tenían un percentil 10 y 3 respectivamente, de peso al nacer, en comparación con el 10% y 3% para la población normal (OR 3,32; IC del 95%: 2,39-4,56 y OR 4,54; IC del 95%: 2,84 - 7,04). También se observó una mayor incidencia de muerte fetal en el grupo de CC en comparación con población normal (2,5% versus 0,4%) (OR 9,45; IC del 95%: 3.35 - 23.3).

Tabla 5. Comparación de los resultados perinatales maternos y fetales en los distintos grupos de cardiopatías congénitas, y comparados con el grupo control. PEG: pequeño para la edad gestacional (crecimiento en percentil10); RCIU: retaso de crecimiento intrauterino, A-V: defectos valvulares atrioventriculares, LVOT: Obstrucción del tracto de salida del ventrículo izquierdo. ** valor $p < 0.01$ y *** valor $p < 0.001$ comparado con los controles.

Complicaciones	Grupo control (n=6035)	Cardiopatías Congénitas			
		Todos (n=279)	Group 1 A-V (n=104)	Group 2 Conotruncales (n=102)	Group 3 LVOT (n=73)
Preclamsia OR 5.96 (3.19-10.54)	75 (1.2%)	16(5.7%) ***	8(7.7%) ***	6(5.8%) ***	2(2.7%)
PEG OR 3.32 (2.39-4.56)	603 (10%)	59(21.1%) ***	17(16.3%)*	21(20.6%) ***	21(28.8%)****
RCIU <p3 OR 4.54 (2.84-7.04)	181 (3%)	27(9.7%) ***	7(6.7%)	9(8.8%) **	11(15%)****
Muerte intraútero OR 9.45 (3.35-23.3)	21 (0.35%)	7(2.5%) ***	4(3.8%) ***	2(1.9%)	1(1.4%)

7.2 Estudio 2: Cambios longitudinales en las biometrías y la hemodinámica cerebroplacentaria en fetos con cardiopatía congénita.

Durante el período de estudio se realizaron 444 exploraciones en 119 fetos con CC. Con una mediana de 2 mediciones por cada feto (rango: 2-9). Las variables demográficas, perinatales y neonatales se resumen en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Características de los 3 grupos de CC, clasificados en función del patrón de oxigenación cerebral. Los datos se presentan como media \pm DS o porcentaje (n). Grupo 1: bajo contenido de sangre placentaria; Grupo 2: contenido intermedio de sangre placentaria y sistémica; Grupo 3: alto contenido de sangre placentaria. PEG (pequeño para la edad gestacional) definido como el peso al nacer por debajo del percentil 10. HC: circunferencia cefálica

Group CC (n=119)					
<i>Parámetros</i>	<i>Grupo 1</i> <i>n=64</i>	<i>Grupo 2</i> <i>n=35</i>	<i>Grupo 3</i> <i>n=20</i>	<i>Todos</i>	<i>p</i>
Edad maternal (años)	33 \pm 5	32 \pm 6	32 \pm 6	32 \pm 5	0.230
Edad gestacional al parto (semanas)	39.2 \pm 1.6	39.0 \pm 1.7	39.3 \pm 1.8	39.1 \pm 1.6	0.669
Tipo de parto					
Vaginal	56.3(36)	51.4(18)	65.0(13)	56.3(67)	0.129
Fórceps	23.4(15)	11.4(4)	20.0(4)	19.3(23)	
Cesárea	20.3(13)	37.1(13)	15.0(3)	24.4(29)	
Preclamsia	4.7(3)	5.7(2)	5.0(1)	5.0(6)	0.975
Sexo					
Masculino	60.9(39)	45.7(16)	65.0(13)	57.1(68)	0.253
Femenino	39.1(25)	54.3(19)	35.0(7)	42.9(51)	
Peso al nacimiento (gr)	3243 \pm 613	3037 \pm 570	3062 \pm 577	3153 \pm 598	0.202
Percentil peso nacimiento	47 \pm 36	41 \pm 32	36 \pm 34	44 \pm 35	0.424
PEG p10	57.8(37)	65.7(23)	40.0(8)	57.2(68)	0.201
PEG p5	51.6(33)	54.3(19)	35.0(7)	49.6(59)	0.497
Talla nacimiento (cm)	50.2 \pm 2.4	48.8 \pm 3.0	49.2 \pm 4.1	49.6 \pm 2.9	0.085
Talla nacimiento (Z-score)	0.39 \pm 1.14	-0.26 \pm 1.45	-0.05 \pm 2.00	0.13 \pm 1.42	0.085
HC nacimiento (cm)	33.4 \pm 1.5	33.6 \pm 1.7	33.6 \pm 1.6	33.5 \pm 1.5	0.798
HC nacimiento (Z-score)	-0.63 \pm 1.14	-0.49 \pm 1.31	-0.46 \pm 1.27	-0.56 \pm 1.21	0.798
Apgar <7 a los 5 minutos	4.7(3)	2.9(1)	0(0)	3.4(4)	0.599
pH arteria umbilical <7.10	1.6(1)	5.7(2)	0(0)	2.5(3)	0.338

La distribución de los tipos de CC en función del patrón de oxigenación cerebral se muestra en la **Tabla 7**. Sesenta y cuatro (53,7%) fetos se incluyen en el Grupo 1 con una oxigenación cerebral baja en contenido placentario, 35 (29,4%) en el grupo 2 con una oxigenación cerebral mixta entre sangre placentaria y sistémica y 20 (16,8%) en el grupo 3 con una oxigenación cerebral de alto origen placentario.

Tabla 7. Distribución de los tipos de cardiopatía congénita (CC) en la población de estudio de acuerdo con el contenido esperado de sangre placentaria.

Cardiopatías congénitas (n=119)	n
<i>Grupo 1: Bajo contenido de sangre placentaria</i>	64
Transposición de grandes arterias	33
Coartación de Aorta	21
Estenosis aórtica	5
Ventrículo izquierdo hipoplásico	4
Síndrome de Shone	1
<i>Group 2: Contenido intermedio de sangre placentaria y sistémica</i>	35
Tetralogía de Fallot	13
Defecto del septo aurículo-ventricular	6
Ventrículo derecho de doble salida	4
Ventrículo único de doble entrada	2
Defectos del septo interventricular	3
Isomerismo	3
Truncus	2
Ventrículo derecho de doble salida + atresia mitral	1
Ventrículo único de doble entrada + arco aórtico hipoplásico	1
<i>Group 3: Alto contenido de sangre placentaria</i>	20
Estenosis pulmonar	8
Atresia Tricuspídea	7
Anomalía de Ebstein	4
Atresia pulmonar	1

La comparación entre los parámetros biométricos y Doppler en la primera exploración, en los 3 grupos de CC, se muestran en la **Tabla 8 y la Tabla 9**. No se observan diferencias significativas entre los grupos en la edad gestacional a la primera exploración ecográfica, el peso fetal estimado ni en el percentil de peso fetal estimado.

Los fetos con CC en el momento del diagnóstico, presentan una biometrías cefálicas más pequeñas (BPD $-1,32 \pm 0,99$ Zs, p9; HC $-0,79 \pm 1,02$ Zs, p21); con un AC y FL normal (AC $0,49 \pm 0,88$ Zs, p69; FL $-0,04 \pm 0,49$ Zs, p48). En el 38% y en el 25% de los casos respectivamente, el DBP y la HC estaban por debajo del percentil cinco. Las variables biométricas de inclusión no mostraron diferencias significativas entre los grupos, con la excepción de la AC, que fue mayor en el grupo 3 en comparación con el grupo 2 ($p = 0,009$).

Los parámetros Doppler se mantuvieron dentro de los rangos de la normalidad en los fetos con CC en el segundo trimestre: IP-UA Zs ($-0,45 \pm 0,65$, p33), IP-MCA Zs ($-0,36 \pm 1,28$, p36), CPR Zs ($-0,29 \pm 1,37$, p39) y IP-Ut Zs ($0,17 \pm 2,20$, p57). Sin embargo, el 18% de los casos de CC presentaron un IP-MCA y un CPR por debajo del percentil 5 en la primera exploración ecográfica. Cuando estos parámetros se analizaron según el tipo de patrón de oxigenación cerebral, la UtA y la UA no mostraron diferencias entre los grupos; mientras que el IP-MCA Zs y el CPR Zs fueron significativamente menores en los grupos con un patrón de oxigenación cerebral alterado ($p < 0,001$ y $p = 0,007$, respectivamente).

Tabla 8. Comparación de los parámetros biométricos en la primera exploración en los fetos con CC clasificados en grupos según el patrón esperado de oxigenación cerebral. Los datos se muestran como media \pm DS. Grupo 1: bajo contenido de sangre placentaria; Grupo 2: contenido intermedio de sangre placentaria y sistémica; Grupo 3: alto contenido de sangre placentaria. CC: cardiopatía congénita, EG: edad gestacional, BPD: diámetro biparietal, HC: circunferencia cefálica, AC: circunferencia abdominal, FL: longitud femoral. * Valor $p < 0,05$ con respecto al Grupo 1; ‡ valor $p < 0,05$ con respecto al Grupo 2.

Grupo CC (n=119)					
Parámetros	Grupo 1 n=64	Grupo 2 n=35	Grupo 3 n=20	Todos	p
EG primera eco (semanas)	24.0 \pm 4.3	22.5 \pm 3.1	23.9 \pm 4.5	23.6 \pm 4.1	0.176
PFE (gramos)	769 \pm 626	589 \pm 366	759 \pm 494	717 \pm 546	0.307
PFE percentil	20 \pm 28	15 \pm 29	25 \pm 30	19 \pm 28	0.529
<i>Variables biométricas</i>					
BPD (mm)	58.1 \pm 12.0	54.4 \pm 10.5	57.6 \pm 12.6	56.9 \pm 11.7	0.315
HC (mm)	210.7 \pm 43.1	199.0 \pm 36.6	207.2 \pm 43.3	207.7 \pm 41.3	0.408
AC (mm)	193.8 \pm 45.8	172.7 \pm 33.8	191.3 \pm 41.7	187.1 \pm 42.6	0.056
FL (mm)	41.9 \pm 10.7	37.9 \pm 8.9	40.8 \pm 10.9	40.6 \pm 10.3	0.190
BPD Z-score	- 1.41 \pm 0.92	-1.27 \pm 1.03	- 1.10 \pm 1.15	- 1.32 \pm 0.99	0.467
HC Z-score	- 0.90 \pm 0.99	- 0.61 \pm 0.98	- 0.72 \pm 1.16	- 0.79 \pm 1.02	0.395
AC Z-score	0.56 \pm 0.91	0.15 \pm 0.77	0.87 \pm 0.75‡	0.49 \pm 0.88	0.009
FL Z-score	- 0.04 \pm 0.47	- 0.08 \pm 0.54	0.02 \pm 0.52	- 0.04 \pm 0.49	0.743

Tabla 9. Comparación de los parámetros Doppler en la primera exploración en los fetos con CC clasificados en grupos según el patrón esperado de oxigenación cerebral. Los datos se muestran como media \pm DS. Grupo 1: bajo contenido de sangre placentaria; Grupo 2: contenido intermedio de sangre placentaria y sistémica; Grupo 3: alto contenido de sangre placentaria. CC: cardiopatía congénita; IP: Índice de pulsatilidad; UA: arteria umbilical, MCA: arteria cerebral media, CPR: Ratio cerebro-placentario, UtA: arterias uterinas. * Valor $p < 0,05$ con respecto al Grupo 1; ‡ valor $p < 0,05$ con respecto al Grupo 2.

Grupo CC (n=119)					
Parámetros	Grupo 1 n=64	Grupo 2 n=35	Grupo 3 n=20	Todos	p
<i>Variables Doppler</i>					
IP UA	1.17 \pm 0.20	1.25 \pm 0.18	1.16 \pm 0.15	1.18 \pm 0.19	0.206
IP MCA	1.59 \pm 0.32	1.74 \pm 0.23	2.08 \pm 0.51*‡	1.72 \pm 0.39	<0.001
CPR	1.38 \pm 0.44	1.45 \pm 0.32	1.81 \pm 0.55*	1.48 \pm 0.47	0.008
IP UtA	1.62 \pm 4.39	1.04 \pm 0.27	1.06 \pm 0.13	1.37 \pm 3.29	0.742
IP UA Z-score	- 0.47 \pm 0.68	- 0.39 \pm 0.67	- 0.45 \pm 0.55	- 0.45 \pm 0.65	0.888
IP MCA Z-score	- 0.83 \pm 1.09	- 0.21 \pm 0.89	0.75 \pm 1.50*‡	- 0.36 \pm 1.28	<0.001
CPR Z-score	-0.62 \pm 1.40	- 0.31 \pm 1.11	0.65 \pm 1.19*	- 0.29 \pm 1.37	0.007
UtA PI Z-score	0.23 \pm 2.83	0.03 \pm 1.09	0.25 \pm 0.46	0.17 \pm 2.20	0.936

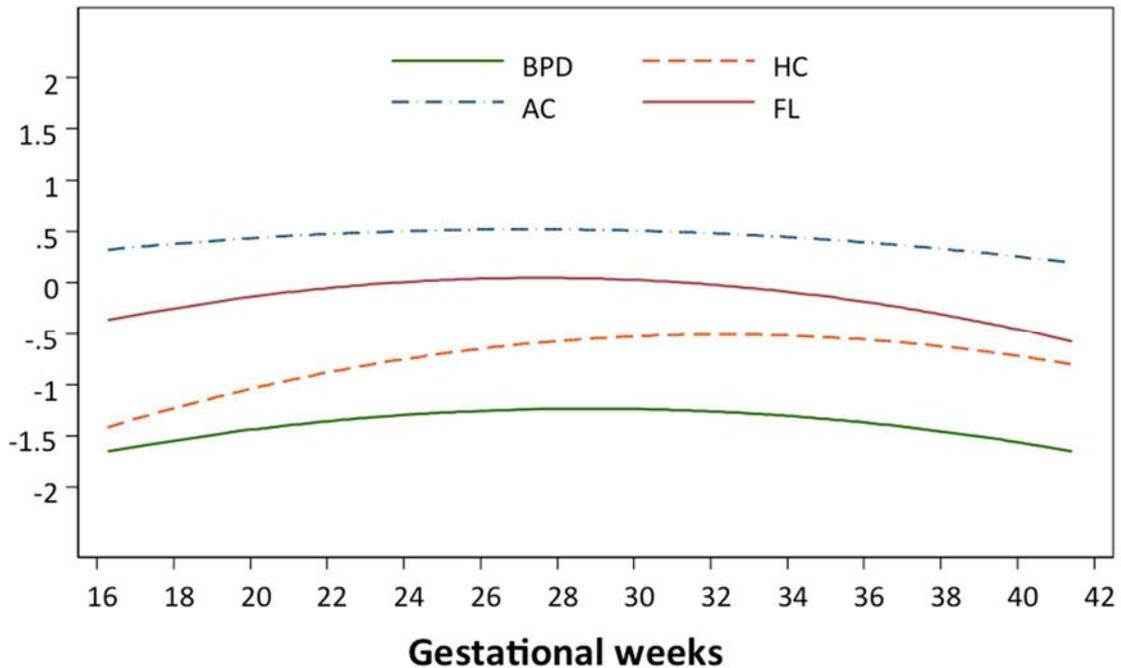
Posteriormente se realizaron modelos lineales mixtos para estudiar la evolución a lo largo de la gestación de las distintas medidas biométricas y los parámetros Doppler. Los resultados se muestran en la **Tabla 10** y en distintas figuras.

En la **Figura 12** se muestra el comportamiento longitudinal de los distintos parámetros biométricos en los fetos con CC; 444 observaciones fueron realizadas en 119 fetos. Tal y como muestra la figura podemos observar que los fetos con CC tienen unas biometrías cefálicas más pequeñas que la población general en el momento del diagnóstico, mostradas en la figura con las líneas de color verde (BPD) y amarillo (HC). Los valores de BPD en el momento del diagnóstico se sitúan en $-1,32 \pm 0,99$ Zs (percentil 9); y los de HC en $-0,79 \pm 1,02$ Zs (percentil 21); Podemos observar también que ésta tendencia se mantiene a lo largo de toda la gestación, confirmándose al nacimiento, con una HC de $-0,56 \pm 1,21$ Zs (percentil 31). No se observaron diferencias significativas entre los grupos de estudio en el análisis longitudinal de las biometrías cefálicas o corporales durante toda la gestación.

Tabla 10. Resumen de los datos de los modelos lineales mixtos para medidas repetidas de datos biométricos y parámetros Doppler en fetos con CC. Todos los parámetros se muestran en Z-scores. EG, edad gestacional; ES, error estándar; IC, intervalo de confianza; BPD, diámetro biparietal; HC, circunferencia cefálica; AC, circunferencia abdominal; FL, longitud femoral; PI, Índice de pulsatilidad; UA, arteria umbilical; MCA, arteria cerebral media; RCP, ratio cerebroplacentario; UtA, arterias uterinas.

		<i>Parte mixta</i>			<i>Parte aleatoria</i>	
Variables		Intercepción	EG (semanas)	EG (semanas)²	Paciente (ES)	Residuo (ES)
BPD	<i>Estimado</i>	-1.7413	0.0729	-0.0026	0.74 (0.06)	0.61 (0.03)
	<i>95% CI</i>	(-2.1813; - 1.3014)	(0.0063; 0.1394)	(-0.0049; - 0.0004)		
	<i>p</i>	-	0.0318	0.0204		
HC	<i>Estimado</i>	-1.5664	0.1222	-0.0035	0.77 (0.06)	0.64 (0.03)
	<i>95% CI</i>	(-2.0304; - 1.1025)	(0.0519; 0.1925)	(-0.0059; - 0.0012)		
	<i>p</i>	-	0.0007	0.0032		
AC	<i>Estimado</i>	0.2758	0.0403	-0.0016	0.62 (0.05)	0.66 (0.03)
	<i>95% CI</i>	(-0.1885; 0.7402)	(-0.0312; 0.1118)	(-0.0040; 0.0007)		
	<i>p</i>	-	0.2691	0.1779		
FL	<i>Estimado</i>	-0.4649	0.0821	-0.0033	0.44 (0.04)	0.52 (0.02)
	<i>95% CI</i>	(-0.8238; - 0.1060)	(0.0266; 0.1375)	(-0.0051; - 0.0014)		
	<i>p</i>	-	0.0037	0.0005		
IP UA	<i>Estimado</i>	-1.6915	0.1956	-0.0052	0.41 (0.04)	0.51 (0.02)
	<i>95% CI</i>	(-2.1316; - 1.2515)	(0.1312; 0.2600)	(-0.0073; - 0.0031)		
	<i>p</i>	-	<0.001	<0.001		
IP MCA	<i>Estimate</i>	0.2517	-0.0815	0.0035	0.76 (0.09)	1.06 (0.05)
	<i>95% CI</i>	(-0.6798; 1.1832)	(-0.2226; 0.0596)	(-0.0011; 0.0081)		
	<i>p</i>	-	0.2577	0.1319		
CPR	<i>Estimate</i>	0.3932	-0.1133	0.0038	0.78 (0.09)	1.02 (0.05)
	<i>95% CI</i>	(-0.5829; 1.3693)	(-0.2611; 0.0345)	(-0.0010; 0.0086)		
	<i>p</i>	-	0.1330	0.1164		
IP UtA	<i>Estimate</i>	-1.6565	0.1970	-0.0027	1.05 (0.10)	0.78 (0.05)
	<i>95% CI</i>	(-2.5102; - 0.8028)	(0.0590; 0.3351)	(-0.0074; 0.0019)		
	<i>p</i>	-	0.0052	0.2503		

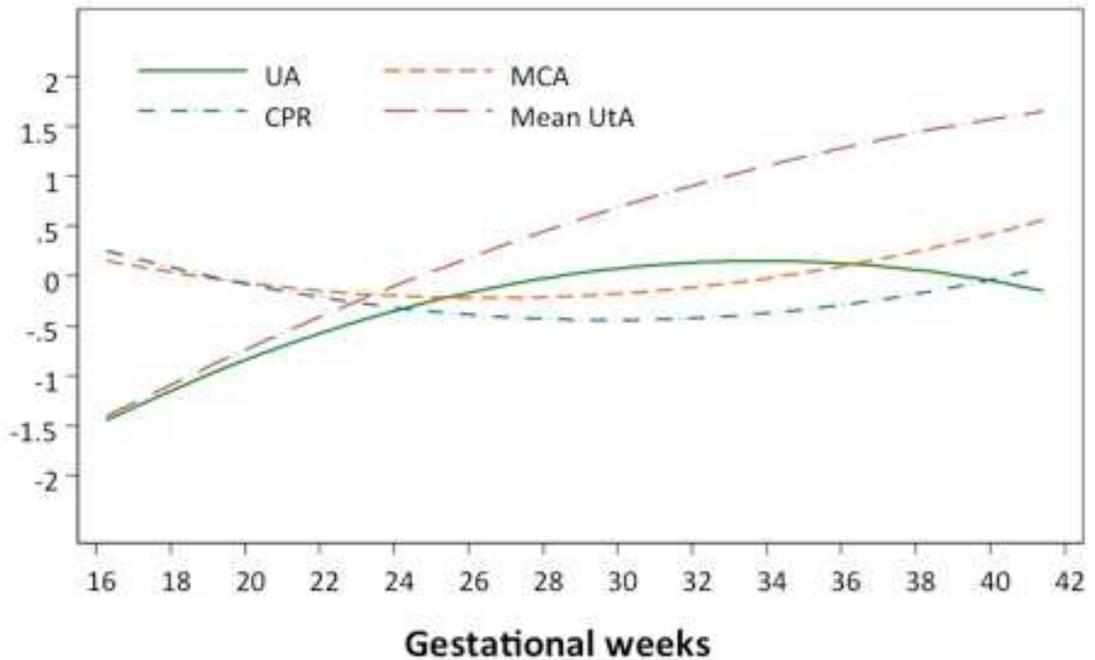
Figura 12. Análisis longitudinal de los parámetros biométricos en los fetos con CC. Todos los parámetros se muestran en Z-scores. BPD, diámetro biparietal; HC, circunferencia cefálica; AC, circunferencia abdominal; FL, longitud femoral



En la **Figura 13** se muestra el comportamiento longitudinal de las distintas variables Doppler; 391 exploraciones se realizaron en 90 fetos con CC. Podemos observar cómo tanto la UA como las UtA Zs aumentan con la edad gestacional, que son más pronunciados en el caso del Doppler de las UtA. Al final del embarazo, el 61% de las mujeres tienen un IP medio de las UtA por encima del percentil 95.

Por otro lado, la MCA y el CPR Zs mostraron una tendencia, aunque no significativa a aumentar a medida que avanza la gestación.

Figura 13. Análisis longitudinal de los parámetros Doppler en los fetos con CC. Todos los parámetros se muestran en Z-scores. PI, Índice de pulsatilidad; UA, arteria umbilical; MCA, arteria cerebral media; RCP, ratio cerebroplacentario; UtA, arterias uterinas.



La comparación del IP MCA Zs en los 3 distintos grupos de CC a lo largo de la gestación se muestra en la **Figura 14**. EL IP MCA Zs es más bajos en el grupo con un peor nivel esperado de oxigenación cerebral (Grupo 1) y este grupo mostró un aumento significativo con edad gestacional ($p=0,02$), mientras que el comportamiento de los otros 2 grupos se mantuvo estable durante la gestación. La comparación del IP UtA Zs entre los 3 grupos de CC a lo largo de la gestación se muestra en la **Figura 15**. Los IP UtA Zs fueron más altos en el grupo con una teórica mejor oxigenación cerebral (Grupo 3). Podemos observar también que todos los grupos muestran un aumento cuadrático significativo con la edad gestacional ($p = 0,005$).

Figura 14. Análisis longitudinal del índice de pulsatilidad de la arteria cerebral media (IP MCA) en los fetos con CC, clasificados en 3 grupos en función del patrón de oxigenación cerebral. Los parámetros se muestran en Z-scores. Grupo 1: bajo contenido de sangre placentaria; Grupo 2: contenido intermedio de sangre placentaria y sistémica; Grupo 3: alto contenido de sangre placentaria.

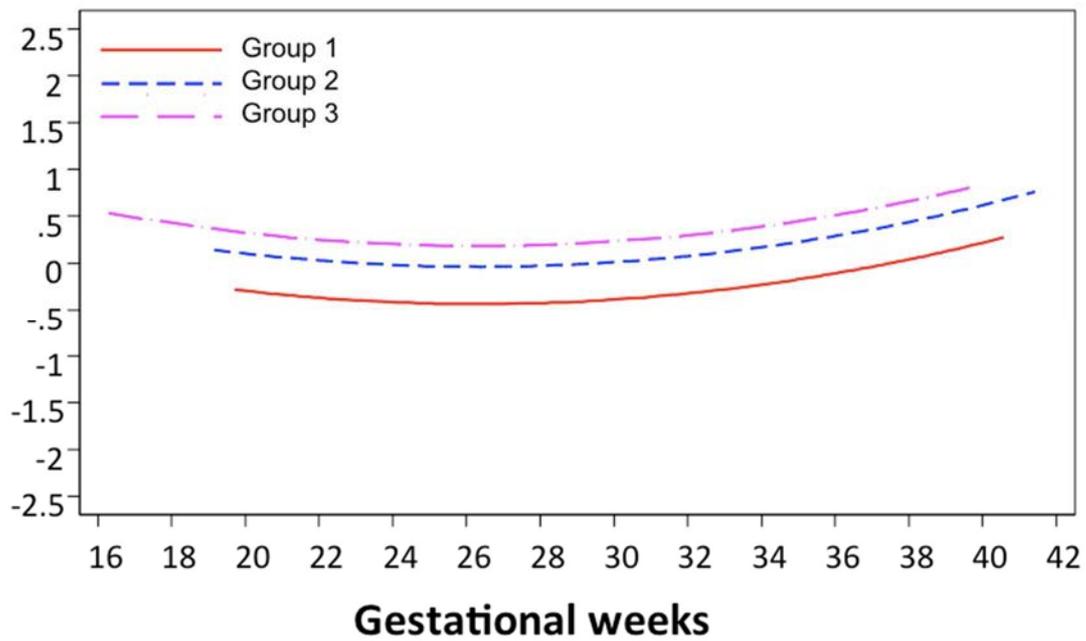
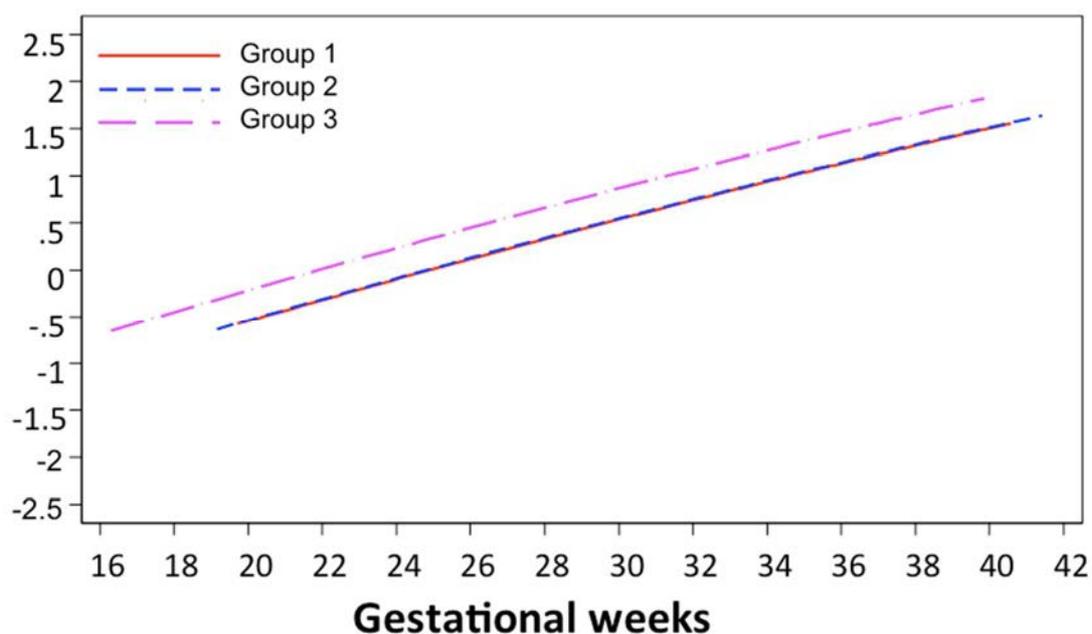


Figura 15. Análisis longitudinal del índice medio de pulsatilidad de las arterias uterinas (IP UtA) en los fetos con CC, clasificados en 3 grupos en función del patrón de oxigenación cerebral. Los parámetros se muestran en Z-scores Grupo 1: bajo contenido de sangre placentaria; Grupo 2: contenido intermedio de sangre placentaria y sistémica; Grupo 3: alto contenido de sangre placentaria.



7.3 Estudio 3: Expresión cerebral de distintos genes angiogénicos en las cardiopatías congénitas.

Finalmente, en el tercer estudio se analizó el tejido cerebral de 15 fetos con CC y 12 fetos sin CC (CTRL). No se observaron diferencias en las características maternas, en la edad gestacional ni en el modo de parto entre los grupos (21.07 ± 0.35 versus 20.79 ± 0.49 semanas, CC vs. CTRL, respectivamente).

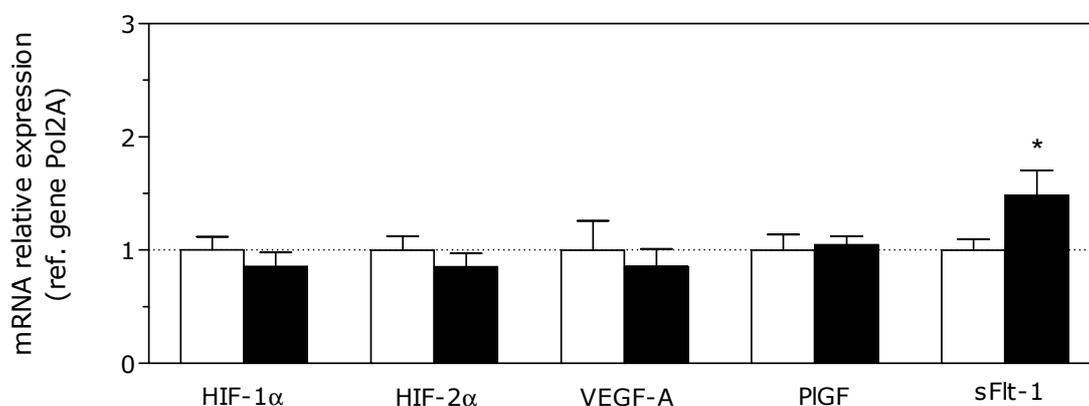
La presencia de CC fue diagnosticada por ecografía prenatal y confirmada en la autopsia. Los tipos de defectos cardíacos se enumeran en la **Tabla 11**.

Tabla 11. Tipos de defectos cardíacos congénitos analizados en el grupo de estudio. HLHS, Síndrome del corazón izquierdo hipoplásico; TGA, Transposición de grandes arterias.

	Número de casos (%)
Defecto del septo interventricular	4 (27)
HLHS	5 (33)
Atresia tricuspídea	2 (13)
Tetralogía de Fallot	2 (13)
TGA	2 (13)

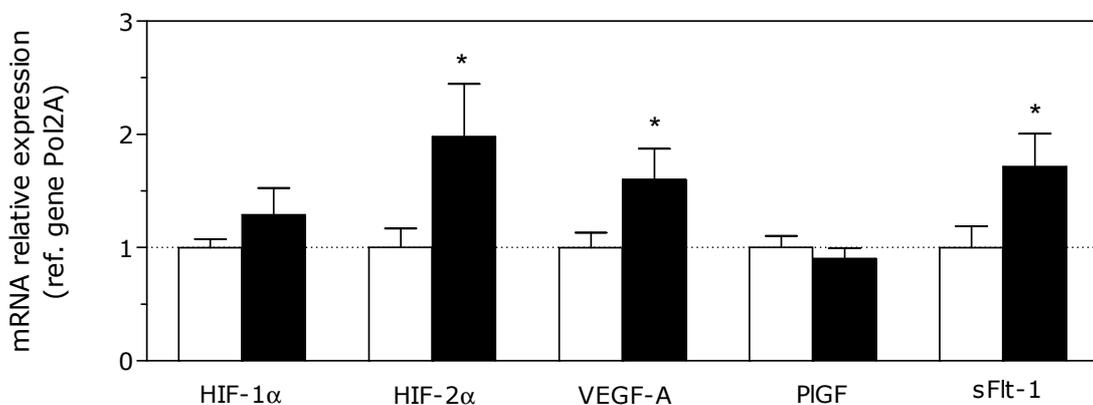
La expresión génica en la corteza frontal de los fetos con CC y los fetos CTRL se presenta en la **Figura 16**. No se observaron cambios significativos en la expresión de ARNm de HIF-1 α , HIF-2 α , VEGF-A y PIGF entre los grupos. Sin embargo, la expresión de sFlt-1 expresión fue más elevada en los fetos con CC en comparación con los controles (48%, $p = 0,0431$).

Figura 16. HIF-1 α , HIF-2 α , HVEGF-A y PIGF, en la corteza frontal de tejido cerebral fetal en fetos con CC (columnas negras) y fetos controles (columnas blancas). Las diferencias se han analizado mediante la prueba T de Student o la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney, según corresponda. Los datos se presentan como media \pm DS. * $p < 0.05$. HIF-1 α , Hypoxia Inducible Factor 1-alpha; HIF-2 α , Hypoxia Inducible Factor 2-alpha; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; PIGF, placentar growth factor.



Respecto a los ganglios basales y al hipotálamo la expresión de HIF-2 α , VEGF-A y sFlt-1 fue significativamente más alta en los fetos con CC que en el grupo control (98%, p = 0,0456, 60%, p = 0,0432 y 72%, p = 0,0369). En cambio el factor pro-angiogénico PIGF no mostro cambios significativos. Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la expresión de mRNA de HIF-1 α entre los dos grupos de estudio **Figura 17**.

Figura 17. HIF-1 α , HIF-2 α , HVEGF-A y PIGF, en los ganglios basales y el hipotálamo de tejido cerebral fetal en fetos con CC (columnas negras) y fetos controles (columnas blancas). Las diferencias se han analizado mediante la prueba T de Student o la prueba no paramétrica de U Mann-Whitney, según corresponda. Los datos se presentan como media \pm DS. *p < 0.05. HIF-1 α , Hypoxia Inducible Factor 1-alpha; HIF-2 α , Hypoxia Inducible Factor 2-alpha; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; PIGF, placental growth factor.



8. DISCUSIÓN

8. DISCUSIÓN

8.1 Estudio 1: Complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en gestantes portadoras de fetos con cardiopatía congénitas

En este primer estudio se evalúa la incidencia de las complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en las gestantes, portadoras de un feto con CC. Nuestros datos muestran, por primera vez, una incidencia significativamente mayor de preclamsia, RCIU y muerte fetal en estos casos en comparación con la población normal, por ese motivo mereció su publicación en la revista *The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine*

Se trata del primer estudio publicado en el que se estudian este tipo de complicaciones en gestaciones portadoras de fetos afectados de CC, y en el que se reporta una mayor incidencia de estas, sugiriendo una relación entre la insuficiencia placentaria y las CC.

Estudios previos habían reportado un mayor riesgo de complicaciones obstétricas en mujeres embarazadas con cardiopatía coronaria (81)(82)(83)(84). Entre las complicaciones más prevalentes destacan los problemas hipertensivos.

En un estudio llevado a cabo en 1302 gestaciones, en pacientes con CC, las complicaciones obstétricas más prevalentes fueron las complicaciones hipertensivas en un 12,2%. En este mismo estudio se describe 4% de mortalidad perinatal (84). En otro estudio en el que se incluyeron 599 embarazos en mujeres con diversos tipos de cardiopatías, congénitas y adquiridas, la incidencia de complicaciones hipertensivas fue del 4%, y de estas en un 2% evolucionó a preclamsia.

El primer estudio, que encontramos en la literatura, en el cual se apunta hacia una posible relación entre la alteración placentaria y las CC, se llevó a cabo en 209 gestantes con una CC y 70 gestantes sanas. Se observó una mayor incidencia de complicaciones obstétricas y perinatales en gestantes con CC respecto a las gestantes controles (58.9% vs 32.9%, $P < 0.0001$) y (35.4% vs 18.6%, $P = 0.008$) respectivamente. Describen un 5,7% de casos preclamsia

y un 16,3% de fetos pequeños para la edad gestacional (85). En este mismo estudio se analizaron los flujos útero placentarios mediante Doppler a nivel de la arteria umbilical y se observó un aumento estadísticamente significativo del índice de pulsatilidad (IP) y del índice de resistencia en dicha arteria en gestantes con CC respecto a las gestantes controles, y a de más la alteración de estos parámetros Doppler se asoció a un resultado perinatal adverso, sugiriendo como hemos dicho una posible asociación entre la alteración placentaria y las CC.

Estudios en animales han demostrado la implicación de los factores angiogénicos en la embriogénesis del corazón. Así, por ejemplo, una delección heterocigótica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) causa la muerte del embrión debido a su incapacidad para formar el árbol vascular (86)(87); o el bloqueo de los receptores VEGF en embriones de peces cebra, resultó en un defecto funcional y estructural en el desarrollo de las válvulas cardíacas, lo que sugiere que estos receptores están involucrados en la formación de dichas válvulas (60).

Como ya hemos comentado en la introducción el Placental Growth Factor (PlGF) es una glicoproteína de la familia VEGF, y la Soluble fms-like Tyrosine Kinase 1 (sFlt-1) es un potente antagonista tanto del VEGF como del PlGF (88). En la literatura encontramos descrita una disminución del PlGF en sangre materna a las 11-13 semanas de gestación en gestaciones en las que se ha desarrollado una preclamsia (89). Un estudio llevado a cabo por nuestro grupo demostró que también encontramos una disminución del PlGF a nivel sérico, en las mismas semanas de gestación, en gestantes portadoras de fetos con defectos cardíacos valvulares y conotruncuales (64).

Siguiendo esta línea, estudios posteriores, llevados a cabo también por nuestro grupo, describieron una disminución del PlGF sérico materno y un aumento de sFlt-1 a las 18-37 semanas de gestación en la sangre de gestantes con fetos afectados de cardiopatías valvulares o conotruncuales (66).

En el presente estudio se describe una mayor incidencia de complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria, como son la preclamsia y el RCIU, en gestaciones con fetos afectados de una CC. El aumento de estas complicaciones en estas mujeres apoya la hipótesis de que existe una desregulación intrínseca de las vías relacionadas con la angiogénesis que afectaría tanto a nivel placentario como a nivel cardíaco, condicionando a la vez una mala formación del sistema cardíaco y de la placenta.

Se observó una incidencia significativamente mayor de preclamsia en pacientes con defectos valvulares y conotruncales, este hallazgo coinciden con nuestros estudios previos, en los que el aumento de niveles de PIGF y la disminución de los niveles de sFlt-1 en sangra materna fue significativamente mayor en estos dos tipo de defectos cardíacos. Estos hallazgos apuntan hacia la existencia de una vía fisiopatológica común que conduciría al desarrollo de la preclamsia durante la gestación y al desarrollo de algunos tipos de CC. El hecho de que el aumento de complicaciones relacionadas con la insuficiencia placentaria sea significativo en las malformaciones conotruncales y valvulares; y no así en los defectos de obstrucción de salida del ventrículo izquierdo (LVOT), se explicaría por el origen distintos de estas patologías, pues sabemos que el origen de los LVOT es complejo y multifactorial (64). A de más el hecho de que la incidencia de preclamsia no fuera significativamente mayor en este grupo, apoya el hecho de que exista una placentación adecuada en estos pacientes.

En nuestra población de estudio, hubieron un 2,5% de muertes fetales intrauterinas sin causa aparente y 1 de cada 5 recién nacidos con CC presentó un bajo peso al nacimiento. Aunque la asociación entre las CC complejas, el bajo peso al nacimiento y la muerte fetal es bien conocida (15), sus causas siguen siendo poco claras.

Existen varias teorías al respecto, las más globalmente aceptada, postula que estas biometrías menores típicas de los fetos con CC, son consecuencia de una disminución de la distribución de oxígeno y del flujo sanguínea a nivel corporal, causada por la morfología anormal del corazón de

los fetos con defectos cardíacos, que condiciona unos circuitos vasculares distintos de los que tiene un feto con un corazón normal.

Sin embargo, nuestro estudio muestra que el peso al nacer es independiente de la severidad de la CC y de la hemodinámica del flujo sanguíneo intraútero, siendo en los 3 grupos estudiados, significativamente menor que en la población normal, sin mostrar diferencias entre los distintos tipos de CC. Además, encontramos en la literatura reportada la relación entre niveles disminuidos de PIGF en sangre materna y un percentil bajo de peso al nacimiento en neonatos con CC; hecho que apoya que una placentación anómala podría contribuir a disminuir el potencial de crecimiento de los fetos con CC.

Este estudio reporta, por primera vez, un mayor riesgo de preclamsia en mujeres portadoras de un feto con CC. Nuestros datos sugieren que estas mujeres tienen un riesgo aumentado de complicaciones obstétricas y perinatales relacionadas con la insuficiencia placentaria, y apoya así la hipótesis de que existe una relación entre las CC y una placentación anómala, abriendo una ventana las futuras investigaciones en este sentido.

8.2 Estudio 2: Cambios longitudinales en las biometrías y la hemodinámica cerebroplacentaria en fetos con cardiopatía congénita.

El objetivo de nuestro segundo estudio fue el de evaluar, en fetos con CC, la relación entre el desarrollo cefálico durante el período fetal y la insuficiencia placentaria según el grado de oxigenación cerebral determinado por el tipo de cardiopatía.

Nuestros datos confirman que los fetos con CC tienen unas biometrías cefálicas menores en el segundo trimestre de embarazo, respecto a los fetos sanos. Sin embargo, las principales aportaciones de este estudio han sido que por primera vez describimos como estas biometrías cefálicas, permanecen

significativamente por debajo de la normalidad a lo largo de toda la gestación y que la hemodinámica placentaria no muestra un deterioro significativo hasta el final del embarazo, siendo este deterioro independiente del tipo de CC.

Las CC se asocian con una prevalencia relativamente alta de lesiones cerebrales en pruebas de neuroimagen y un riesgo significativo de retraso del desarrollo neurológico (90). Aunque la asociación entre las CC complejas y un neurodesarrollo anormal está bien establecida, sus causas siguen siendo inciertas.

Se ha postulado que estas biometrías patológicas específicas de las CC son debidas a la disminución de la oxigenación y a la alteración del flujo sanguíneo cerebral que sufren los fetos con CC, secundariamente a la morfología anormal de su corazón. Dependiendo del tipo de CC, las estructuras a través de las cuales se va a producir la irrigación cerebral se van a ver alteradas, de la misma manera, que debido a esta morfología anómala la sangre oxigenada procedente de la placenta, en vez de ir de manera preferencial hacia el sistema nervioso central, puede verse dirigida hacia otros territorios, como en el caso de la transposición de grandes arterias (TGA), o puede mezclarse con sangre desoxigenada antes de llegar al cerebro, como en la tetralogía de Fallot.

Se ha descrito una relación directa entre la reducción de la oxigenación cerebral y el deterioro del crecimiento cefálico en los fetos con CC, utilizando la cardi resonancia magnética en contraste de fase (91).

Más recientemente se ha publicado, por parte del grupo del Hospital Clínic de Barcelona, con el que hemos colaborado en este trabajo, que en el tercer trimestre del embarazo, los fetos con CC presentan cambios significativos en las biometría cefálicas, la perfusión cerebral, el desarrollo cortical y el metabolismo cerebral, evidenciando alteraciones más severas en aquellos casos con una esperada reducción estricta de la oxigenación cerebral debido a el tipo de CC, como en los LVOT o la TGA (14).

En nuestro estudio observamos una disminución más significativa de los valores del IP de MCA y del CPR en el grupo de CC con menor grado de oxigenación cerebral (grupo 1), no obstante, hay que destacar que todos los grupos de CC, independientemente del patrón de oxigenación cerebral, tienen unas biometrías cefálicas menores en comparación con los datos de normalidad (69), confirmando así lo publicado en estudios anteriores al nuestro (67) (92). Hay que destacar, que nuestro estudio demuestra, por primera vez, que estos cambios a nivel de las biometrías cefálicas persisten a lo largo de toda la gestación, y se mantienen estables, sin observarse un agravamiento al final del embarazo. Desde nuestro punto de vista, este hecho sugiere que la causa del neurodesarrollo anómalo en los niños con CC, pues estar presente desde el inicio de la gestación.

Uno de los hallazgos más interesantes de nuestro estudio, es el hecho de que tanto el IP de la AU como el IP medio de las empeoran al final de la gestación, y hasta un 61% de casos muestran un IP medio de las UtA-PI por encima del percentil 95, este hecho indica una alta resistencia en los vasos uterinos (UtA), sugiriendo cierto grado de deterioro placentario en estas gestaciones. En estudios recientes, llevados a cabo por nuestro grupo, ya hemos postulado hacia una placentación anormal en las gestaciones con fetos con CC, a través del estudio de los factores angiogénicos en sangre materna. Los datos del presente estudio, corroborarían esta hipótesis, al mostrar una resistencia aumentada en los vasos uterinos, traduciendo así una insuficiencia placentaria en estos casos. Esta placentación anómala podría tener un papel importante tanto en la etiología y formación de este corazón anómalo, como en el desarrollo del sistema nervioso central y por lo tanto en el neurodesarrollo de estos fetos (64)(66).

Como ya hemos explicado las mujeres con CC, durante la gestación presentan más complicaciones obstétricas y perinatales que las mujeres sanas (85). Además, en nuestro primer estudio hemos demostrado que existe una incidencia significativamente mayor de preclamsia, RCIU restricción y muerte fetal en aquellas gestaciones portadoras de un feto con CC. En el presente estudio, el 5% de las mujeres desarrollaron preclamsia y

aproximadamente el 50% de los recién nacidos con CC tenían un peso por debajo del percentil 5 al nacimiento, corroborando los datos del primer estudio.

Sabemos que cambios en las concentraciones plasmáticas de los factores angiogénicos y antiangiogénicos así como de sus ratios en la madre implican un mayor riesgo de desarrollar preclamsia o recién nacidos pequeños para la edad gestacional (50) (57). Además, nuestro grupo, en estudios anteriores, ha reportado niveles reducidos en suero materno de PIGF i sFlt1 en pacientes con fetos portadores de defectos cardíacos valvulares y conotruncales (64) (65). Y también hemos descrito una correlación entre valores maternos disminuidos de PIGF y un menor percentil de peso al nacer en los recién nacidos con CC (65). Todos estos hallazgos sugieren que el deterioro placentario presente en estas gestaciones, contribuye a disminuir el potencial de crecimiento los fetos con CC.

Utilizando la cardioRM se ha descrito una menor saturación de oxígeno en la vena umbilical de fetos con CC, hecho que puede reflejar alteraciones a nivel de la placenta (91) (93). A de más, en un estudio llevado a cabo con placentas procedentes de gestaciones con fetos con CC, se ha observado una alta incidencia de anomalías placentarias, tanto en patología placentaria como en su histopatología, pudiendo afectar tanto al crecimiento, al desarrollo, al parto o a los resultados perinatales (94).

Globalmente, todos estos estudios sugieren que las CC pueden estar asociadas con una alteración intrínseca de la placentación que es más pronunciada al final de la gestación, con la consiguiente hipoxia placentaria.

Actualmente, no se realiza de manera sistemática un screening de preclamsia o insuficiencia placentaria en las gestaciones con CC. Basándonos en los datos de los dos estudios presentados hasta el momento en esta tesis, recomendamos de manera periódica realizar un examen del crecimiento fetal y de los parámetros Dopplers a todos los fetos con CC; así como un screening

sistemático de preclamsia a todas las gestantes portadoras de un feto con CC, como parte del seguimiento prenatal rutinario en estas pacientes.

Probablemente existen vías patológicas distintas a la propia anatomía y hemodinámica anormal de los corazones con CC, que expliquen el desarrollo neurológico prenatal anormal en estos fetos. Una de las vías alternativas propuestas sería la formación anómala de los vasos sanguíneos.

En un estudio llevado a cabo por *McQuillen et al.*, en el que se estudió mediante RM a 62 neonatos con CC, se describe un 39% de lesiones cerebrales radiológicamente aparentes, y en su mayoría con afectación de la sustancia blanca (3). Esta alta incidencia de lesiones de sustancia blanca, es notable en esta población y difiere de los hallazgos encontrados en neonatos con lesiones hipóxicos-isquémicas por otras causas. *Donofrio y Massaro* afirman que esta diferencia, entre las lesiones cerebrales de los neonatos con CC y aquellos que han sufrido una lesión hipóxico-isquémica de otra causa, sugiere que las lesiones cerebrales adquiridas prenatalmente, de los fetos con CC, pueden estar relacionadas con un desarrollo anormal del lecho vascular cerebral de dichos fetos, que los haría más susceptibles a estas lesiones (68).

Licht et al. (95) , utilizando una puntuación de maduración basada en cuatro parámetros, que incluyen: la mielinización, la inflexión cortical la involución de las bandas de migración de las células gliales y la presencia de tejido de la matriz germinal, encontró un retraso en el desarrollo cerebral intraútero de aproximadamente 1 mes en neonatos con LVOT y TGA. A su vez, *Beca et al.* (96) reportaron un 20% de lesiones de sustancia blanca antes de la cirugía en neonatos con CC y que la severidad de la inmadurez cerebral al nacer predice el nivel de deterioro del desarrollo neurológico a los 2 años de edad, en estos niños.

Se ha planteado la hipótesis de que el desarrollo cerebral anómalo debido a la CC, puede aumentar la vulnerabilidad del cerebro a la inestabilidad hemodinámica perioperatoria y a las lesiones intraoperatorias hipóxico-isquémicas (8). La escasa mejoría en los resultados neurológico de los niños

con CC en los últimos años, a pesar del gran avance en la mejora de la supervivencia, las estrategias de prevención quirúrgicas y el manejo de estos pacientes, refuerza esta hipótesis; evidenciando el hecho de que deben existir factores innatos de los pacientes, así como una maduración cerebral anormal, que superan el impacto que las distintas estrategias preventivas actuales puedan tener en la protección del cerebro de estos niños y determinan el grado de desarrollo neurológico.

Nuestros hallazgos muestran, que el bajo peso al nacer de los neonatos con CC es a expensas de HC y BPD, con el AC y el FL que permaneciendo dentro de los rangos de la normalidad y estables durante toda la gestación; estos valores indican que la insuficiencia placentaria, a pesar de estar presente como indica un patrón de mayor resistencia en los flujos placentarios (AU y AUT), no es el principal contribuyente del bajo peso al nacer de estos neonatos, sino que un patrón patológico común y co-existente de angiogénesis anormal puede explicar una formación anormal de vasos, como vía común en todos los sistemas de los fetos con CC, incluyendo el corazón, el cerebro y la placenta.

Este estudio, tiene varias limitaciones, que debemos comentar, En primer lugar, debido a la naturaleza retrospectiva del estudio, no se obtuvieron todos los parámetros Doppler en todos los pacientes.

En segundo lugar, un menor tamaño cefálico, por sí solo, no equivale necesariamente a un retraso en el desarrollo neurológico. Y dado que no hemos evaluado el neurodesarrollo en estos niños, solo podemos especular en cuanto a una posible relación entre unas biometrías cefálicas pequeñas y un retraso del desarrollo neurológico. Sin embargo, se ha demostrado que el Doppler cerebral fetal y las biometrías cefálicas en el momento del diagnóstico son predictores independientes del desarrollo anormal al nacimiento, haciendo hincapié en el valor predictivo de estos hallazgos (92), y por lo tanto reafirmando nuestros resultados.

En tercer lugar, a pesar del gran número de exámenes realizados y casos incluidos en el estudio, el tamaño de la muestra de cada subgrupo de CC puede seguir siendo demasiado limitado para sacar conclusiones. Además, los casos en nuestro estudio con los tipos más severos de CC, como el síndrome de hipoplasia del corazón izquierdo (LVOT), eran pocos. Así pues, la inclusión de casos graves podría haber aumentado las diferencias observadas en los distintos tipos de CC.

En conclusión, los fetos con CC tienen una cabeza menor desde el segundo trimestre del embarazo, que se mantiene pequeña durante toda la gestación; y una tendencia hacia una mayor resistencia en las UtA y la UA. Estos datos puede indicar la coexistencia de un neurodesarrollo anómalo relacionado con las CC y con cierto grado de insuficiencia placentaria. Nuestros datos confirman la aparición temprana de mecanismos que podrían contribuir a un déficit del neurodesarrollo y abren así una ventana a la investigación de vías para la predicción y la prevención del neurodesarrollo anormal en los fetos con CC.

8.3 Estudio 3: Expresión cerebral de distintos genes angiogénicos en las cardiopatías congénitas.

Finalmente, y a tenor de los resultados de los trabajos anteriores, en este trabajo quisimos dar un paso más estudiando la expresión de distintos factores angiogénicos y antiangiogénicos en el tejido cerebral de fetos con CC, así como la expresión de distintos marcadores de hipoxia crónica; con el objetivo de comprobar si existe una desregulación en las vías angiogénicas involucradas en el desarrollo cerebral, que consecuentemente confiere un riesgo aumentado de lesión cerebral a estos fetos.

Los datos de Este estudio representan la primera evidencia de angiogénesis anormal en el tejido cerebral de fetos humanos con CC; mostrando un aumento de la expresión de VEGF-A y sFlt-1. En concreto, la expresión de sFlt-1 se muestra incrementada entre 1,5 y 1,7 veces en las

muestras cerebrales de fetos con CC, en comparación con los controles, tanto a nivel de la corteza frontal como de los ganglios basales y el hipotálamo. Además, observamos una sobreproducción de HIF-2 α en las muestras procedentes de los ganglios basales y el hipotálamo, probablemente secundario a una hipoxia crónica.

Hasta el momento, varios estudios han demostrado la relación entre los defectos cardíacos y un retraso en el desarrollo neurológico. Aunque inicialmente se ha atribuido este neurodesarrollo anómalo a la cirugía cardíaca postnatal (5), como ya hemos comentado a lo largo de esta tesis, que, actualmente, tenemos evidencia de que otros mecanismos fisiopatológicos están implicados. Mediante técnicas de neuroimagen se ha demostrado a nivel cerebral una alta prevalencia de alteraciones prenatales, así como un volumen cerebral reducido, retrasos en la maduración y en la circulación, en fetos con CC en el tercer trimestre de la gestación (97)(90)(98). Y tal y como hemos presentado en el segundo estudio de esta tesis mediante ecografía, los fetos con CC tienen unas biometrías cefálicas disminuidas desde el segundo trimestre de la gestación (99).

En nuestro tercer estudio, hemos obtenido tejido cerebral del córtex frontal, de los ganglios basales y del hipotálamo, debido a que estas regiones son responsables respectivamente de las habilidades cognitivas y motoras, que son las principales áreas que se encuentran afectadas en los niños con CC (100)(101).

Por otro lado, tal y como hemos descrito en el primer estudio de esta tesis (102) y en trabajos previos llevados a cabo por nuestro grupo (64) (65), existe una relación entre las CC y una placentación anómala. En el primer estudio de esta tesis describimos una incidencia mayor de complicaciones relacionadas con la insuficiencia placentaria, como son la preclamsia, el RCIU y la muerte neonatal en las gestaciones con fetos con CC, comparado con la población normal. Siguiendo esta línea, recientemente un gran estudio ha confirmado la asociación entre las CC y las anomalías placentarias, este estudio ha investigado el peso de las placentas, conocido indicador de la

función placentaria, en gestaciones con fetos afectados de CC; observando que el peso de las placentas es significativamente menor en tres subtipos de neonatos con CC (103).

La desregulación de la angiogénesis en la placenta y en la circulación materno-fetal ha surgido como uno de las características fisiopatológicas del desarrollo de la insuficiencia placentaria y de sus consecuencias, la preclamsia y el RCIU (89) (104). La angiogénesis anormal también se ha relacionado con otras afecciones obstétricas y fetales como la miocardiopatía periparto y los defectos cardíacos fetales, abriendo nuevos retos para nuestra comprensión de la afectación angiogénica en la función cardiovascular materna y el desarrollo cardíaco fetal (65) (105).

En los fetos con defectos cardíacos, se cree que el deterioro neurológico es consecuencia de la disminución de la distribución de oxígeno y del flujo sanguíneo al cerebro debido a una morfología anormal del corazón. Un vínculo directo entre la reducción de la oxigenación cerebral y el deterioro del crecimiento cerebral en los fetos con CC se ha reportado recientemente utilizando la cardioRM en contraste de fase (91). Los fetos con CC presentaron cambios significativos en las biometrías cefálicas, la perfusión cerebral, el desarrollo cortical y el metabolismo cerebral, con signos de alteraciones más severas en casos con una reducción esperada en la oxigenación cerebral en el tercer trimestre del embarazo (14). Además el segundo estudio de esta tesis ha demostrado unas biometrías cefálicas disminuidas en todos los tipos de CC en el segundo trimestre del embarazo y como estos cambios persisten a lo largo de toda la gestación, sin empeorar hacia el final del embarazo (99) , lo que sugiere que la causa del desarrollo anormal del cerebro de estos fetos podría estar ya presente desde el inicio del embarazo. De hecho, *Abu-Rustum et al.* han descrito recientemente que las alteraciones del volumen de la cabeza podrían ser detectadas en las primeras 11-14 semanas de gestación en fetos con CC (106).

Siguiendo la línea de nuestro segundo estudio y como ya hemos comentado, diferentes vías patogénicas deben existir, a parte de la propia morfología anómala del corazón, que conducen al desarrollo cerebral anormal de manera prenatal, y una de ellas, según nuestras investigaciones, podría ser la formación intrínsecamente anormal de vasos cerebrales.

Donofrio y Massaro afirman que la diferencia, entre las lesiones cerebrales de los neonatos con CC y aquellos que han sufrido una lesión hipóxico-isquémica de otra causa, sugiere que las lesiones cerebrales adquiridas prenatalmente, de los fetos con CC, pueden estar relacionadas con un desarrollo anormal del lecho vascular cerebral de dichos fetos (68). *Licht et al.* utilizando una puntuación de maduración basada en cuatro parámetros, encontró un retraso en el desarrollo cerebral intraútero de aproximadamente 1 mes (95); y a su vez, *Beca et al.* reportaron que la severidad de la inmadurez cerebral al nacer predice el nivel de deterioro del desarrollo neurológico a los 2 años de edad (96),

Otra posible explicación es que estos casos han sufrido lesiones vasculares debido a una formación vascular anormal, que retrasaría la maduración y el crecimiento. Se ha planteado la hipótesis de que el desarrollo cerebral anómalo debido a las CC, puede aumentar la vulnerabilidad del cerebro a la inestabilidad hemodinámica perioperatoria y a las lesiones intraoperatorias hipóxico-isquémicas (8). A partir de los resultados de este y otros estudios, podemos especular que la formación anormal de vasos es una característica común en todos los sistemas fetales de los fetos con CC, incluyendo el corazón, la placenta y el cerebro.

Hasta la fecha, los modelos animales con CC no han sido lo suficientemente adecuados, para entender los déficits neurológicos observados en este tipo de pacientes. Por un lado, casi todos los modelos genéticos de ratón resultan en la letalidad embrionaria (107)(108)(109). Por otro lado, algunos modelos animales grandes se han utilizado para entender la patología cerebral de las CC, de CHD, pero estos estudios se han visto limitados por las técnicas quirúrgicas (110)(111)(112). Por lo tanto, con el fin de comprender

mejor los déficits neurológicos observados en los pacientes con CC, se debería desarrollar un modelo en el que sólo aparecieran defectos cardíacos intraútero y permitir el nacimiento y posterior desarrollo postnatal (113). Sin embargo, utilizando un modelo experimental de ratón, con inactivación temprana homocigota del VEGF en el cerebro embrionario, fue posible describir que el VEGF, vía secreción local por progenitores neurales y/o neuronas (114), induce la angiogénesis cerebral y proporciona señales instructivas para la correcta organización espacial de la vasculatura (115). Además, en un modelo cerebral infartado se encontró una sobreexpresión del mRNA y de los niveles de VEGF y del PlGF en diferentes tipos celulares de (116). Los efectos neuroprotectores de PlGF también se han descrito usando un modelo in vitro de lesión isquémica cerebral en ratas (117). Recientemente, *Luna et.al*, han descrito que la deficiencia de PlGF se asocia con un deterioro del desarrollo vascular cerebral en un modelo de ratones PlGF - / - (118). En nuestro estudio, aunque no se encontraron diferencias en la expresión de PlGF, si se observó una expresión leve de PlGF y una sobreproducción de sFlt-1 en los casos con CC comparados con los controles, que señalan que existe un cierto ambiente anti-angiogénico en ambas áreas del cerebro, que podría conducir a una formación y ramificación anormal de los vasos cerebrales de los fetos con CC.

Nuestro estudio demuestra que una expresión del mRNA de VEGF-A aumentada significativamente en los ganglios basales y el hipotálamo en los fetos con CC en comparación con los controles (60%, $p = 0,0432$). Resultados anteriores han demostrado la importancia de la regulación estricta de la expresión de VEGF-A durante el desarrollo cardíaco (59). Y sabemos que la expresión del gen para VEGF-A está estrechamente controlada y se estimula bajo condiciones de hipoxia, a través de mecanismos transcripcionales y post-transcripcionales (119)(120).

En este estudio también hemos evaluado la presencia de marcadores de hipoxia en el tejido cerebral fetal de los fetos con CC, analizando la expresión de HIF-1a y HIF-2a. La expresión de HIF-2a, un marcador de hipoxia, se incrementó en los ganglios basales y el hipotálamo. Estos datos concuerdan con un estudio de autopsia realizado por *Glauser et al.*, en el que se encontró

que el 45% de los bebés con Hipoplasia del corazón izquierdo (LVOT) tenían lesiones isquémicas hipóxicas y / o hemorragia intracraneal (121). Además, estudios in vitro previos demostraron que HIF-2a activa preferentemente la expresión de VEGF (122). En nuestro estudio, el aumento de la hipoxia inducible es compatible con los estudios hemodinámicos Doppler que apuntan hacia el hecho que un cierto grado de hipoxia cerebral podría estar presente en los cerebros de fetos con CC (14).

Hay varias explicaciones para estos hallazgos: En primer lugar, los fetos con CC podrían tener una placentación intrínsecamente alterada que podría causar cierto grado de hipoxia fetal, pudiendo estar relacionado con un desarrollo anormal tanto a nivel cardíaco como cerebral. Alternativamente, la expresión de los distintos factores angiogénicos en el tejido cerebral demuestra que, aunque la hipoxia puede inducir la angiogénesis, no se observa una sobreexpresión de PlGF. Sin embargo la expresión de sFlt-1 si se incrementó en la corteza basal y frontal, independientemente de la expresión de los genes de hipoxia. Estos hallazgos y el hecho de que se observaron resultados similares en el cerebro y en la sangre de estos casos, señalan que la angiogénesis anormal podría ser una de las vías patógenas intrínsecas que conducen a un desarrollo cerebral anormal.

Como limitaciones de este estudio, Reconocemos que los datos histológicos de estos cerebros podrían haber ofrecido información importante en relación a la interpretación de esta potencial asociación, y que futuros estudios que incluyan esta información serían muy interesantes. Finalmente, comentar que los cambios en la expresión génica no son casuales, sino secundarios al propio ambiente creado por la CC, sin embargo, como la evaluación de estos factores se hizo en el segundo trimestre del embarazo, y no durante el proceso de embriogénesis, no podemos determinar con certeza si el desequilibrio angiogénico es el causante del desarrollo anormal del cerebro o más bien es una consecuencia del defecto cardíaco.

Que tengamos constancia, este es el primer estudio que evalúa la relación entre la angiogénesis cerebral y el desarrollo neurológico anómalo en las CC. Nuestros resultados sugieren que las CC determinan una angiogénesis intrínsecamente anómala y una situación de hipoxia crónica que pueden estar presentes en el cerebro fetal. Nuestros resultados coinciden con los de estudios observacionales previos que de forma consistente mostraron que prenatalmente existen unos factores de riesgo neurológicos en las CC. Estudios adicionales podrían ser de interés para dilucidar en qué medida está implicada la angiogénesis en el desarrollo del cerebro de los fetos con CC.

9. FUTURAS DIRECCIONES

9. FUTURAS DIRECCIONES

Durante los años en los que se ha completado esta tesis, ha cobrado importancia la hipótesis de que el desarrollo cerebral anómalo debido a las CC, puede aumentar la vulnerabilidad del cerebro a la inestabilidad hemodinámica perioperatoria y a las lesiones intraoperatorias hipóxico-isquémicas. No obstante a pesar de la importancia y la frecuencia de las complicaciones neurológicas, no se conocen las causas por las que se producen estas lesiones ni los factores de riesgo que determinan mayor repercusión.

A pesar de la evidencia acumulada sobre la relación de las CC con neurodesarrollo anómalo, los estudios realizados desde una perspectiva clínica se basan en series pequeñas. Por este motivo, las direcciones futuras de este grupo de investigación se basarán en intentar establecer si existen diferentes espectros de daño neurológico según el tipo de CC y lo que es más importante, identificar los mecanismos que producen este daño neurológico de manera temprana, para poder desarrollar herramientas clínicas que permitan establecer el riesgo de daño neurológico en un paciente concreto y por tanto poder establecer en un futuro estrategias preventivas y terapéuticas. Solo cuando los mecanismos que producen el daño cerebral se comprendan, será posible postular métodos que mejoren el resultado neurológico de estos niños.

Para ello, nuestro grupo está actualmente llevando a cabo un estudio prospectivo, multicéntrico, que tiene como título *Desarrollo de métodos predictivos basados en la integración de factores prenatales y postnatales para la detección de neurodesarrollo anómalo en cardiopatías congénitas (Children NEURO-HEART Study)*.

Se trata de un estudio dotado con una beca por el Instituto de Salud Carlos III (PI13/01449) en el que aparte de nuestro centro, el Hospital de la Vall d'Hebrón de Barcelona, participan 5 centros españoles: Hospital Universitario 12 de Octubre de Madrid, Hospital Universitario La Paz de Madrid, Hospital

Universitario La Fe Valencia, Institut Universitari Dexeus Barcelona y el Hospital Clínic-Maternitat-San Joan de Dèu de Barcelona.

Este estudio está basado en los resultados obtenidos en las investigaciones expuestas en esta tesis, y pretende evaluar el desarrollo neurológico de los niños con CC, así como definir una asociación entre factores pre y post-natales y un neurodesarrollo anómalo en estos pacientes, con el objetivo de poder desarrollar algoritmos predictivos y estrategias preventivas.

10. CONCLUSIONES

10. CONCLUSIONES

1. Las gestantes portadoras de un feto con CC presentan una mayor incidencia de complicaciones relacionadas con la insuficiencia placentaria, tales como preclamsia, RCIU y muerte intraútero.
2. Estos datos confirman que la presencia de un desbalance angiogénico placentario en estas pacientes condiciona mayor riesgo de complicaciones de la gestación y por tanto creemos necesario el correcto despistaje de dichas complicaciones en estas pacientes.
3. Los fetos con CC tienen unas biometrías cefálicas menores desde el segundo trimestre del embarazo, que se mantiene pequeñas durante toda la gestación, independientemente del tipo de CC. Nuestros datos confirman la aparición temprana de mecanismos que pueden conducir a un peor neurodesarrollo en los niños con CC
4. El aumento progresivo de la resistencia en las UtA i la UA a lo largo de la gestación, sugiere un grado progresivo de insuficiencia placentaria en las gestaciones con fetos con CC, hecho que concuerda con el mayor riesgo a desarrollar complicaciones placentarias en estos casos.
5. En el tejido cerebral de los fetos con CC existe una regulación anómala global de la angiogénesis, con una tendencia positiva hacia un ambiente anti-angiogénico, hecho que sugiere que los fetos con CC tienen una angiogénesis intrínsecamente anormal, que puede contribuir a una perfusión cerebral anómala, así como a un desarrollo neurológico posterior anormal.

11. BIBLIOGRAFÍA

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Dolk H, Loane M, Garne E, European Surveillance of Congenital Anomalies (EUROCAT) Working Group. Congenital heart defects in Europe: prevalence and perinatal mortality, 2000 to 2005. *Circulation*. 2011 Mar 1;123(8):841–9.
2. Bellinger DC, Jonas RA, Rappaport LA, Wypij D, Wernovsky G, Kuban KC, et al. Developmental and neurologic status of children after heart surgery with hypothermic circulatory arrest or low-flow cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med*. 1995 Mar 2;332(9):549–55.
3. McQuillen PS, Barkovich AJ, Hamrick SEG, Perez M, Ward P, Glidden DV, et al. Temporal and anatomic risk profile of brain injury with neonatal repair of congenital heart defects. *Stroke J Cereb Circ*. 2007 Feb;38(2 Suppl):736–41.
4. O'Hare B, Bissonnette B, Bohn D, Cox P, Williams W. Persistent low cerebral blood flow velocity following profound hypothermic circulatory arrest in infants. *Can J Anaesth J Can Anesth*. 1995 Nov;42(11):964–71.
5. Ferry PC. Neurologic sequelae of open-heart surgery in children. An "irritating question." *Am J Dis Child* 1960. 1990 Mar;144(3):369–73.
6. Majnemer A, Limperopoulos C, Shevell M, Rosenblatt B, Rohlicek C, Tchervenkov C. Long-term neuromotor outcome at school entry of infants with congenital heart defects requiring open-heart surgery. *J Pediatr*. 2006 Jan;148(1):72–7.
7. Gaynor JW, Wernovsky G, Jarvik GP, Bernbaum J, Gerdes M, Zackai E, et al. Patient characteristics are important determinants of neurodevelopmental outcome at one year of age after neonatal and infant cardiac surgery. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2007 May;133(5):1344–53, 1353.e1–3.
8. Gaynor JW, Stopp C, Wypij D, Andropoulos DB, Atallah J, Atz AM, et al. Neurodevelopmental Outcomes After Cardiac Surgery in Infancy. *Pediatrics*. 2015 May 1;135(5):816–25.
9. Limperopoulos C, Majnemer A, Shevell MI, Rosenblatt B, Rohlicek C, Tchervenkov C. Neurodevelopmental status of newborns and infants with

congenital heart defects before and after open heart surgery. *J Pediatr*. 2000 Nov;137(5):638–45.

10. Limperopoulos C, Majnemer A, Shevell MI, Rosenblatt B, Rohlicek C, Tchervenkov C. Neurologic status of newborns with congenital heart defects before open heart surgery. *Pediatrics*. 1999 Feb;103(2):402–8.

11. Miller SP, McQuillen PS, Hamrick S, Xu D, Glidden DV, Charlton N, et al. Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease. *N Engl J Med*. 2007 Nov 8;357(19):1928–38.

12. Mahle WT, Tavani F, Zimmerman RA, Nicolson SC, Galli KK, Gaynor JW, et al. An MRI study of neurological injury before and after congenital heart surgery. *Circulation*. 2002 Sep 24;106(12 Suppl 1):I109–14.

13. Hinton RB, Andelfinger G, Sekar P, Hinton AC, Gendron RL, Michelfelder EC, et al. Prenatal head growth and white matter injury in hypoplastic left heart syndrome. *Pediatr Res*. 2008 Oct;64(4):364–9.

14. Masoller N, Sanz-Cortés M, Crispi F, Gómez O, Bennasar M, Egaña-Ugrinovic G, et al. Severity of Fetal Brain Abnormalities in Congenital Heart Disease in Relation to the Main Expected Pattern of in utero Brain Blood Supply. *Fetal Diagn Ther*. 2016;39(4):269–78.

15. Rosenthal GL, Wilson PD, Permutt T, Boughman JA, Ferencz C. Birth weight and cardiovascular malformations: a population-based study. The Baltimore-Washington Infant Study. *Am J Epidemiol*. 1991 Jun 15;133(12):1273–81.

16. Rosenthal GL. Patterns of Prenatal Growth among Infants with Cardiovascular Malformations: Possible Fetal Hemodynamic Effects. *Am J Epidemiol*. 1996 Mar 1;143(5):505–13.

17. Story L, Pasupathy D, Sankaran S, Sharland G, Kyle P. Influence of birthweight on perinatal outcome in fetuses with antenatal diagnosis of congenital heart disease. *J Obstet Gynaecol Res*. 2015 Jun;41(6):896–903.

18. Fetal growth restriction: Diagnosis - UpToDate [Internet]. [cited 2017 Apr 18]. Available from: https://www.uptodate-com.proxy1.athensams.net/contents/fetal-growth-restriction-diagnosis?source=see_link

19. Infants with fetal (intrauterine) growth restriction - UpToDate [Internet]. [cited 2017 Apr 18]. Available from: <https://www.uptodate->

com.proxy1.athensams.net/contents/infants-with-fetal-intrauterine-growth-restriction?source=see_link

20. Battaglia FC, Lubchenco LO. A practical classification of newborn infants by weight and gestational age. *J Pediatr.* 1967 Aug;71(2):159–63.

21. Zhang J, Mikolajczyk R, Grewal J, Neta G, Klebanoff M. Prenatal application of the individualized fetal growth reference. *Am J Epidemiol.* 2011 Mar 1;173(5):539–43.

22. Seeds JW, Peng T. Impaired growth and risk of fetal death: is the tenth percentile the appropriate standard? *Am J Obstet Gynecol.* 1998 Apr;178(4):658–69.

23. Berghella V. Prevention of recurrent fetal growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2007 Oct;110(4):904–12.

24. Martin RJ, Fanaroff AA, Walsh M., *Intrauterine Growth Restriction.* 8th edition. Philadelphia: Fanaroff and Martin's Neonatal-Perinatal Medicine; 2006.

25. Saenger P, Czernichow P, Hughes I, Reiter EO. Small for gestational age: short stature and beyond. *Endocr Rev.* 2007 Apr;28(2):219–51.

26. Resnik R. Intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol.* 2002 Mar;99(3):490–6.

27. Causes of and risk factors for FGR - UpToDate [Internet]. [cited 2017 Apr 18]. Available from: https://www-uptodate-com.proxy1.athensams.net/contents/image?imageKey=OBGYN%2F99966&topicKey=OBGYN%2F6768&rank=1~150&source=see_link&search=FGR

28. Figueras F, Gardosi J. Intrauterine growth restriction: new concepts in antenatal surveillance, diagnosis, and management. *Am J Obstet Gynecol.* 2011 Apr;204(4):288–300.

29. Baschat AA. Pathophysiology of fetal growth restriction: implications for diagnosis and surveillance. *Obstet Gynecol Surv.* 2004 Aug;59(8):617–27.

30. Powe CE, Levine RJ, Karumanchi SA. Preeclampsia, a disease of the maternal endothelium: the role of antiangiogenic factors and implications for later cardiovascular disease. *Circulation.* 2011 Jun 21;123(24):2856–69.

31. Bujold E, Roberge S, Lacasse Y, Bureau M, Audibert F, Marcoux S, et al. Prevention of preeclampsia and intrauterine growth restriction with

aspirin started in early pregnancy: a meta-analysis. *Obstet Gynecol.* 2010 Aug;116(2 Pt 1):402–14.

32. Roberts JM, Cooper DW. Pathogenesis and genetics of pre-eclampsia. *Lancet Lond Engl.* 2001 Jan 6;357(9249):53–6.

33. Marsál K. Intrauterine growth restriction. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2002 Apr;14(2):127–35.

34. Myers GL, Rifai N, Tracy RP, Roberts WL, Alexander RW, Biasucci LM, et al. CDC/AHA Workshop on Markers of Inflammation and Cardiovascular Disease: Application to Clinical and Public Health Practice: report from the laboratory science discussion group. *Circulation.* 2004 Dec 21;110(25):e545–9.

35. Llurba E, Carreras E, Gratacós E, Juan M, Astor J, Vives A, et al. Maternal history and uterine artery Doppler in the assessment of risk for development of early- and late-onset preeclampsia and intrauterine growth restriction. *Obstet Gynecol Int.* 2009;2009:275613.

36. Folkman J. Tumor angiogenesis. *Adv Cancer Res.* 1985;43:175–203.

37. Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes memorial Award lecture. *Cancer Res.* 1986 Feb;46(2):467–73.

38. Fidler IJ. Critical factors in the biology of human cancer metastasis: twenty-eighth G.H.A. Clowes memorial award lecture. *Cancer Res.* 1990 Oct 1;50(19):6130–8.

39. Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. *Cell.* 1991 Jan 25;64(2):327–36.

40. D'Amore PA, Thompson RW. Mechanisms of angiogenesis. *Annu Rev Physiol.* 1987;49:453–64.

41. Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science.* 1989 Dec 8;246(4935):1309–12.

42. Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, et al. Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest.* 1989 Nov;84(5):1470–8.

43. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 15;88(20):9267–71.
44. Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev*. 1997 Feb;18(1):4–25.
45. Holmes K, Roberts OL, Thomas AM, Cross MJ. Vascular endothelial growth factor receptor-2: structure, function, intracellular signalling and therapeutic inhibition. *Cell Signal*. 2007 Oct;19(10):2003–12.
46. Wang A, Rana S, Karumanchi SA. Preeclampsia: the role of angiogenic factors in its pathogenesis. *Physiol Bethesda Md*. 2009 Jun;24:147–58.
47. Bdolah Y, Sukhatme VP, Karumanchi SA. Angiogenic imbalance in the pathophysiology of preeclampsia: Newer insights. *Semin Nephrol*. 2004 Nov 1;24(6):548–56.
48. Reynolds LP, Redmer DA. Angiogenesis in the Placenta. *Biol Reprod*. 2001 Apr 1;64(4):1033–40.
49. Karumanchi SA, Bdolah Y. Hypoxia and sFlt-1 in preeclampsia: the “chicken-and-egg” question. *Endocrinology*. 2004 Nov;145(11):4835–7.
50. Maynard SE, Min J-Y, Merchan J, Lim K-H, Li J, Mondal S, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest*. 2003 Mar 1;111(5):649–58.
51. Levine RJ, Lam C, Qian C, Yu KF, Maynard SE, Sachs BP, et al. Soluble Endoglin and Other Circulating Antiangiogenic Factors in Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2006 Sep 7;355(10):992–1005.
52. Savvidou MD, Noori M, Anderson JM, Hingorani AD, Nicolaides KH. Maternal endothelial function and serum concentrations of placental growth factor and soluble endoglin in women with abnormal placentation. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Diciembre;32(7):871–6.
53. Crispi F, Domínguez C, Llurba E, Martín-Gallán P, Cabero L, Gratacós E. Placental angiogenic growth factors and uterine artery Doppler findings for characterization of different subsets in preeclampsia and in isolated intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol*. 2006 Jul 1;195(1):201–7.

54. Romero R, Nien JK, Espinoza J, Todem D, Fu W, Chung H, et al. A longitudinal study of angiogenic (placental growth factor) and anti-angiogenic (soluble endoglin and soluble VEGF receptor-1) factors in normal pregnancy and patients destined to develop preeclampsia and deliver a small-for-gestational-age neonate. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet*. 2008 Jan;21(1):9–23.
55. Rana S, Powe CE, Salahuddin S, Verlohren S, Perschel FH, Levine RJ, et al. Angiogenic factors and the risk of adverse outcomes in women with suspected preeclampsia. *Circulation*. 2012 Feb 21;125(7):911–9.
56. Verlohren S, Herraiz I, Lapaire O, Schlembach D, Moertl M, Zeisler H, et al. The sFlt-1/PlGF ratio in different types of hypertensive pregnancy disorders and its prognostic potential in preeclamptic patients. *Am J Obstet Gynecol*. 2012 Jan;206(1):58.e1–8.
57. Zeisler H, Llurba E, Chantraine F, Vatish M, Staff AC, Sennström M, et al. Predictive Value of the sFlt-1:PlGF Ratio in Women with Suspected Preeclampsia. *N Engl J Med*. 2016 Jan 7;374(1):13–22.
58. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):435–9.
59. Miquerol L, Langille BL, Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development*. 2000 Sep 15;127(18):3941–6.
60. Lee YM, Cope JJ, Ackermann GE, Goishi K, Armstrong EJ, Paw BH, et al. VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR RECEPTOR SIGNALING IS REQUIRED FOR CARDIAC VALVE FORMATION IN ZEBRAFISH. *Dev Dyn Off Publ Am Assoc Anat*. 2006 Jan;235(1):29–37.
61. Miquerol L, Gertsenstein M, Harpal K, Rossant J, Nagy A. Multiple developmental roles of VEGF suggested by a LacZ-tagged allele. *Dev Biol*. 1999 Aug 15;212(2):307–22.
62. Dor Y, Camenisch TD, Itin A, Fishman GI, McDonald JA, Carmeliet P, et al. A novel role for VEGF in endocardial cushion formation and its potential contribution to congenital heart defects. *Dev Camb Engl*. 2001 May;128(9):1531–8.

63. Armstrong EJ, Bischoff J. Heart Valve Development. *Circ Res*. 2004 Sep 3;95(5):459–70.
64. Llurba E, Syngelaki A, Sánchez O, Carreras E, Cabero L, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor at 11-13 weeks' gestation and fetal cardiac defects. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 Aug;42(2):169–74.
65. Llurba E, Sánchez O, Ferrer Q, Nicolaides KH, Ruíz A, Domínguez C, et al. Maternal and foetal angiogenic imbalance in congenital heart defects. *Eur Heart J*. 2014 Mar;35(11):701–7.
66. Llurba E, Sánchez O, Ferrer Q, Nicolaides KH, Ruíz A, Domínguez C, et al. Maternal and foetal angiogenic imbalance in congenital heart defects. *Eur Heart J*. 2014 Mar;35(11):701–7.
67. Masoller N, Martínez JM, Gómez O, Bennasar M, Crispi F, Sanz-Cortés M, et al. Evidence of second-trimester changes in head biometry and brain perfusion in fetuses with congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014 Aug;44(2):182–7.
68. Donofrio MT, Massaro AN. Impact of congenital heart disease on brain development and neurodevelopmental outcome. *Int J Pediatr*. 2010;2010.
69. Carrascosa A, Fernández JM, Fernández C, Ferrández A, López-Siguero JP, Sánchez E, et al. Spanish growth studies 2008. New anthropometric standards. *Endocrinol Nutr Organo Soc Espanola Endocrinol Nutr*. 2008 Dec;55(10):484–506.
70. Robinson HP, Sweet EM, Adam AH. The accuracy of radiological estimates of gestational age using early fetal crown-rump length measurements by ultrasound as a basis for comparison. *Br J Obstet Gynaecol*. 1979 Jul;86(7):525–8.
71. International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology null, Carvalho JS, Allan LD, Chaoui R, Copel JA, DeVore GR, et al. ISUOG Practice Guidelines (updated): sonographic screening examination of the fetal heart. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2013 Mar;41(3):348–59.
72. Kurmanavicius J, Wright EM, Royston P, Wisser J, Huch R, Huch A, et al. Fetal ultrasound biometry: 1. Head reference values. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999 Feb;106(2):126–35.

73. Kurmanavicius J, Wright EM, Royston P, Zimmermann R, Huch R, Huch A, et al. Fetal ultrasound biometry: 2. Abdomen and femur length reference values. *Br J Obstet Gynaecol*. 1999 Feb;106(2):136–43.
74. Hadlock FP, Harrist RB, Shah YP, King DE, Park SK, Sharman RS. Estimating fetal age using multiple parameters: a prospective evaluation in a racially mixed population. *Am J Obstet Gynecol*. 1987 Apr;156(4):955–7.
75. 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.
76. Arduini D, Rizzo G. Normal values of Pulsatility Index from fetal vessels: a cross-sectional study on 1556 healthy fetuses. *J Perinat Med*. 1990;18(3):165–72.
77. Baschat AA, Gembruch U. The cerebroplacental Doppler ratio revisited. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2003 Feb;21(2):124–7.
78. Gómez O, Figueras F, Fernández S, Bennasar M, Martínez JM, Puerto B, et al. Reference ranges for uterine artery mean pulsatility index at 11-41 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Aug;32(2):128–32.
79. Nevo O, Many A, Xu J, Kingdom J, Piccoli E, Zamudio S, et al. Placental expression of soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in singletons and twin pregnancies with intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Jan;93(1):285–92.
80. Sánchez O, Llurba E, Marsal G, Domínguez C, Aulesa C, Sánchez-Durán MA, et al. First trimester serum angiogenic/anti-angiogenic status in twin pregnancies: relationship with assisted reproduction technology. *Hum Reprod Oxf Engl*. 2012 Feb;27(2):358–65.
81. Stangl V, Schad J, Gossing G, Borges A, Baumann G, Stangl K. Maternal heart disease and pregnancy outcome: a single-centre experience. *Eur J Heart Fail*. 2008 Sep;10(9):855–60.
82. Siu SC, Sermer M, Colman JM, Alvarez AN, Mercier LA, Morton BC, et al. Prospective multicenter study of pregnancy outcomes in women with heart disease. *Circulation*. 2001 Jul 31;104(5):515–21.

83. Drenthen W, Pieper PG, Roos-Hesselink JW, van Lottum WA, Voors AA, Mulder BJM, et al. Outcome of pregnancy in women with congenital heart disease: a literature review. *J Am Coll Cardiol*. 2007 Jun 19;49(24):2303–11.
84. Drenthen W, Boersma E, Balci A, Moons P, Roos-Hesselink JW, Mulder BJM, et al. Predictors of pregnancy complications in women with congenital heart disease. *Eur Heart J*. 2010 Sep;31(17):2124–32.
85. Pieper PG, Balci A, Aarnoudse JG, Kampman MAM, Sollie KM, Groen H, et al. Uteroplacental blood flow, cardiac function, and pregnancy outcome in women with congenital heart disease. *Circulation*. 2013 Dec 3;128(23):2478–87.
86. Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O’Shea KS, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 1996 Apr 4;380(6573):439–42.
87. Ziche M, Maglione D, Ribatti D, Morbidelli L, Lago CT, Battisti M, et al. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 1997 Apr;76(4):517–31.
88. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, Delli-Bovi P, Persico MG. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Oct 15;88(20):9267–71.
89. Akolekar R, Zaragoza E, Poon LCY, Pepes S, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008 Nov;32(6):732–9.
90. Khalil A, Suff N, Thilaganathan B, Hurrell A, Cooper D, Carvalho JS. Brain abnormalities and neurodevelopmental delay in congenital heart disease: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014 Jan;43(1):14–24.
91. Sun L, Macgowan CK, Sled JG, Yoo S-J, Manlhiot 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.
92. Masoller N, Sanz-Cortés M, Crispi F, Gómez O, Bennasar M, Egaña-Ugrinovic G, et al. Mid-gestation brain Doppler and head biometry in

fetuses with congenital heart disease predict abnormal brain development at birth. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016 Jan;47(1):65–73.

93. Porayette P, Madathil S, Sun L, Jaeggi E, Grosse-Wortmann L, Yoo S-J, et al. MRI reveals hemodynamic changes with acute maternal hyperoxygenation in human fetuses with and without congenital heart disease. *Prenat Diagn*. 2016 Mar;36(3):274–81.

94. Goff DA, McKay EM, Davey BT, Thacker D, Khalek N, Miesnik SR, et al. Abstract 11260: Placental Abnormalities in Fetal Congenital Heart Disease. *Circulation*. 2011 Nov 22;124(Suppl 21):A11260–A11260.

95. Licht DJ, Shera DM, Clancy RR, Wernovsky G, Montenegro LM, Nicolson SC, et al. Brain maturation is delayed in infants with complex congenital heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009 Mar;137(3):529–36; discussion 536–7.

96. Beca J, Gunn JK, Coleman L, Hope A, Reed PW, Hunt RW, et al. New white matter brain injury after infant heart surgery is associated with diagnostic group and the use of circulatory arrest. *Circulation*. 2013 Mar 5;127(9):971–9.

97. Khalil A, Bennet S, Thilaganathan B, Paladini D, Griffiths P, Carvalho JS. Prevalence of prenatal brain abnormalities in fetuses with congenital heart disease: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016 Sep;48(3):296–307.

98. Li Y, Yin S, Fang J, Hua Y, Wang C, Mu D, et al. Neurodevelopmental delay with critical congenital heart disease is mainly from prenatal injury not infant cardiac surgery: current evidence based on a meta-analysis of functional magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015 Jun;45(6):639–48.

99. Ruiz A, Cruz-Lemini M, Masoller N, Sanz-Cortés M, Ferrer Q, Ribera I, et al. Longitudinal changes in fetal biometrics and cerebroplacental haemodynamics in fetuses with congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol Off J Int Soc Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016 May 23;

100. Snookes SH, Gunn JK, Eldridge BJ, Donath SM, Hunt RW, Galea MP, et al. A systematic review of motor and cognitive outcomes after early surgery for congenital heart disease. *Pediatrics*. 2010 Apr;125(4):e818–27.

101. Schaefer C, von Rhein M, Knirsch W, Huber R, Natalucci G, Caflisch J, et al. Neurodevelopmental outcome, psychological adjustment, and quality of life in adolescents with congenital heart disease. *Dev Med Child Neurol*. 2013 Dec;55(12):1143–9.
102. Ruiz A, Ferrer Q, Sánchez O, Ribera I, Arévalo S, Alomar O, et al. Placenta-related complications in women carrying a foetus with congenital heart disease. *J Matern-Fetal Neonatal Med Off J Eur Assoc Perinat Med Fed Asia Ocean Perinat Soc Int Soc Perinat Obstet*. 2016 Oct;29(20):3271–5.
103. Matthiesen NB, Henriksen TB, Agergaard P, Gaynor JW, Bach CC, Hjortdal VE, et al. Congenital Heart Defects and Indices of Placental and Fetal Growth in a Nationwide Study of 924 422 Liveborn Infants. *Circulation*. 2016 Nov 15;134(20):1546–56.
104. Llurba E, Crispi F, Verlohren S. Update on the pathophysiological implications and clinical role of angiogenic factors in pregnancy. *Fetal Diagn Ther*. 2015;37(2):81–92.
105. Patten IS, Rana S, Shahul S, Rowe GC, Jang C, Liu L, et al. Cardiac angiogenic imbalance leads to peripartum cardiomyopathy. *Nature*. 2012 May 9;485(7398):333–8.
106. Abu-Rustum RS, Ziade MF, Abu-Rustum SE, Daou LS. Are There Head Volume Alterations at 11 to 14 Weeks in Fetuses with Congenital Heart Defects? A First Trimester Case Series. *AJP Rep*. 2016 Apr;6(2):e232–8.
107. Makki N, Capecchi MR. Cardiovascular defects in a mouse model of HOXA1 syndrome. *Hum Mol Genet*. 2012 Jan 1;21(1):26–31.
108. Misra C, Sachan N, McNally CR, Koenig SN, Nichols HA, Guggilam A, et al. Congenital heart disease-causing Gata4 mutation displays functional deficits in vivo. *PLoS Genet*. 2012;8(5):e1002690.
109. Tang S, Snider P, Firulli AB, Conway SJ. Trigenic neural crest-restricted Smad7 over-expression results in congenital craniofacial and cardiovascular defects. *Dev Biol*. 2010 Aug 1;344(1):233–47.
110. Allen JG, Weiss ES, Wilson MA, Arnaoutakis GJ, Blue ME, Talbot CC, et al. Hawley H. Seiler Resident Award. Transcriptional profile of brain injury in hypothermic circulatory arrest and cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg*. 2010 Jun;89(6):1965–71.

111. Haldenwang PL, Strauch JT, Müllem K, Reiter H, Liakopoulos O, Fischer JH, et al. Effect of pressure management during hypothermic selective cerebral perfusion on cerebral hemodynamics and metabolism in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010 Jun;139(6):1623–31.
112. Pastuszko P, Schears GJ, Pirzadeh A, Kubin J, Greeley WJ, Wilson DF, et al. Effect of granulocyte-colony stimulating factor on expression of selected proteins involved in regulation of apoptosis in the brain of newborn piglets after cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012 Jun;143(6):1436–42.
113. Morton PD, Ishibashi N, Jonas RA, Gallo V. Congenital cardiac anomalies and white matter injury. *Trends Neurosci.* 2015 Jun;38(6):353–63.
114. Ogunshola OO, Stewart WB, Mihalcik V, Solli T, Madri JA, Ment LR. Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000 Jan 3;119(1):139–53.
115. Raab S, Beck H, Gaumann A, Yüce A, Gerber H-P, Plate K, et al. Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost.* 2004 Mar;91(3):595–605.
116. Beck H, Acker T, Püschel AW, Fujisawa H, Carmeliet P, Plate KH. Cell type-specific expression of neuropilins in an MCA-occlusion model in mice suggests a potential role in post-ischemic brain remodeling. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002 Apr;61(4):339–50.
117. Du H, Li P, Pan Y, Li W, Hou J, Chen H, et al. Vascular endothelial growth factor signaling implicated in neuroprotective effects of placental growth factor in an in vitro ischemic model. *Brain Res.* 2010 Oct 21;1357:1–8.
118. Luna RL, Kay VR, Rätsep MT, Khalaj K, Bidarimath M, Peterson N, et al. Placental growth factor deficiency is associated with impaired cerebral vascular development in mice. *Mol Hum Reprod.* 2016 Feb;22(2):130–42.
119. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem.* 1995 Aug 25;270(34):19761–6.
120. Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem.* 1996 Feb 2;271(5):2746–53.

121. Glauser TA, Rorke LB, Weinberg PM, Clancy RR. Congenital brain anomalies associated with the hypoplastic left heart syndrome. *Pediatrics*. 1990 Jun;85(6):984–90.

122. Gordan JD, Bertout JA, Hu C-J, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell*. 2007 Apr;11(4):335–47.

12. ANEXO

12. ANEXO

12.1 Anexo 1: Trabajos publicados

12.1.1 Estudio 1: Complicaciones derivadas de la insuficiencia placentaria en gestantes portadoras de fetos con cardiopatía congénitas

ORIGINAL ARTICLE

Placenta-related complications in women carrying a foetus with congenital heart disease

Aina Ruiz¹, Queralt Ferrer², Olga Sánchez^{3,4}, Irene Ribera¹, Silvia Arévalo¹, Onofre Alomar¹, Manel Mendoza¹, Lluís Cabero^{1,3}, Elena Carreras^{1,3}, and Elisa Llurba^{1,3}

¹Department of Obstetrics, Maternal-Foetal Medicine Unit, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma De Barcelona, Barcelona, Spain, ²Department of Paediatric Cardiology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma De Barcelona, Barcelona, Spain, ³Maternal and Child Health and Development Network II (SAMID II) RD12/0026, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain, and ⁴Biochemistry and Molecular Biology Research Centre for Nanomedicine, Vall D'Hebron Research Institute, Barcelona, Spain

Abstract

Introduction: Recent studies pointed to an intrinsically angiogenic imbalance in CHD in the maternal and foetal circulation suggestive of impaired placentation.

Objectives: To assess whether pregnant women with a CHD foetus are at greater risk of placenta-related complications.

Methods: Perinatal results of women with a CDH foetus were compared with those of a non-selected population followed up at our centre. Multiple pregnancies and chromosomal abnormalities were excluded from the analysis.

Results: About 279 pregnancies with CHD fetuses were included. Mothers were classified in three groups according to the foetal cardiac defect: 104 (37.3%) atrioventricular defect, 102 (36.5%) conotruncal anomalies and 73 (26.2%) left-ventricular outflow tract obstruction. A significantly higher incidence of pre-eclampsia was observed in the CHD group compared with the normal population (5.7% versus 1.2% $p < 0.0001$) [OR 5.96 (95% CI - 3.19-10.54)]. About 9.7% of fetuses with CHD had < 3rd birth weight percentile compared with 3% for the normal population [OR 3.32 (95% CI - 2.39-4.56)]. A higher incidence of stillbirth was also observed in the CHD group compared with the normal population (2.5% versus 0.4%) [OR 9.45 (95% CI - 3.35-23.3)].

Conclusions: Women carrying a foetus with CHD have a high risk of pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. The relationship between CHD and placenta-related complications could be an encouraging topic for future research.

Keywords

Congenital heart defects, intrauterine growth restriction, pre-eclampsia

History

Received 29 October 2015

Accepted 15 November 2015

Published online 24 December 2015

Introduction

Congenital heart disease (CHD), a major cause of infant mortality, occurs in approximately 8 per 1000 live births [1,2]; it constitutes one of the most common congenital anomalies and accounts for 20% of stillbirths [3].

Evidence from animal models suggests that impaired angiogenesis is related to abnormal heart development [4-6]. We recently reported that maternal serum PIGF was decreased at 11-13 weeks of gestation in isolated major foetal heart defects, which indicates impaired placental angiogenesis [7]. Furthermore, higher anti-angiogenic expression (sFlt-1, VEGF-A, sEng) was observed in foetal heart tissue and cord blood of fetuses with CHD compared to controls, and lower PIGF and higher sFlt-1 levels were found in maternal

serum at 18-37 weeks of gestation, thereby indicating that these fetuses may have intrinsic altered angiogenesis leading to abnormal formation of the heart [3].

Abnormal angiogenesis in the placenta determines impaired remodelling of maternal spiral arteries and placental underperfusion that may ultimately lead to the development of intrauterine growth restriction (IUGR) and maternal pre-eclampsia (PE), major causes of maternal and perinatal morbidity and mortality [8-11]. Angiogenic factors are known to be implicated in the pathogenesis of these complications. Changes in plasma concentrations of angiogenic and anti-angiogenic factors, or their ratios, in the mother imply a higher risk of her delivering a small-for-gestational age neonate and/or developing PE [12,13]. Raised sFlt1 and low circulating PIGF levels have been observed in both PE [12-16] and isolated IUGR [15,17,18].

Adequate uteroplacental blood flow is necessary for normal pregnancy outcome. Pregnant women with CHD have significantly more obstetric and offspring complications

Address for correspondence: Elisa Llurba, Maternal-Foetal Medicine Unit, Department of Obstetrics, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona Psg. Vall d'Hebron, 129-139 08035 Barcelona, Spain. Tel: +34934893085, +34687743699. E-mail: elisa.llurba@vhir.org

than healthy women; these include a 4-fold increase in the incidence of pre-eclampsia and IUGR [19–22], which has been attributed to abnormal placentation in the context of cardiac dysfunction [23].

We hypothesized that pregnant women carrying a foetus with CHD are at greater risk of impaired placenta-related complications due to an angiogenic imbalance. In an attempt to explore this hypothesis, we conducted a retrospective study in women carrying a foetus with CHD, the main aim of which was to determine the incidence of impaired placental complications such as PE, eclampsia, HELLP syndrome, stillbirth and IUGR.

Materials and methods

Study population and inclusion criteria

A retrospective cohort study was conducted on consecutive gestations with foetal CHD at the Foetal Medicine Unit of the Vall d'Hebron University Hospital between December 2003 and December 2014.

Only foetuses with major CHD (atrioventricular valve defects, conotruncal abnormalities and left-ventricle outflow tract obstructions) were included in the study [3]. Non-structural cardiac anomalies such as tumours or arrhythmias, minor cardiac defects or venous system anomalies were excluded. CHD included in each group are shown in Table 1.

When a CHD was suspected, a detailed foetal anatomy scan was performed and the mothers were offered foetal karyotyping and/or Array-CGH tests if required. The definitive diagnosis of CHD was based either on prenatal examinations by a foetal cardiologist and foetal medicine specialist or postnatal evaluation. Demographic information, maternal medical and obstetric history, ultrasound findings, biometrics and Doppler evaluation, genetic screening, pregnancy outcome and neonatal results were obtained and entered in a complete database. Data collected from multiple sources including maternity, neonatology, cytogenetic and pathology

units were used to screen for adverse perinatal outcomes, malformations and chromosomal abnormalities.

The main outcome was the development of placental impairment complications: (a) pre-eclampsia (PE), (b) HELLP syndrome, (c) stillbirth and (d) IUGR compared with the normal population [24]. Pre-eclampsia was defined according to the diagnostic criteria of the American College of Obstetricians and Gynaecologists [25] and IUGR as birth weight <10th percentile for gestational age.

Perinatal results of women with a CHD foetus were compared with those of a non-selected population of 6025 deliveries with information available followed up at our centre from 2012 to 2013.

Statistical analysis

Inter-group comparisons of maternal characteristics were made using the chi-squared or Fisher's exact tests for categorical variables and the Mann-Whitney *U* test for continuous variables. The *p* value threshold used for significant differences was 0.05.

Student's unpaired *t*-test or Mann-Whitney *U* test, as appropriate, or the Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison post-test were used to determine the significance of inter-group differences in the pre-eclampsia rate. *Z*-scores were calculated for the birth weight percentile.

Statistical analyses were made using the GraphPad Prism software (GraphPad, version 5.0b, San Diego, CA) and Statistical Package for Social Sciences software (SPSS 17.0; Chicago, IL).

Results

Over the study period, 1095 pregnant patients were referred to our unit for a suspected foetal heart defect; of these, 83 were lost to follow-up, 51 had multiple pregnancies [26] and 373 were carrying foetuses with heart anomalies other than those of the inclusion criteria. Of the remaining 588 singleton foetuses with a structural heart disease, 68 were ruled out for chromosomal abnormalities and a further 35 for concomitant major extracardiac abnormalities. In addition, pregnancy was terminated in 206 cases with isolated CHD. The flow chart of the study is shown in Figure 1.

Finally, perinatal outcome was evaluated in 279 pregnancies. Mothers were classified in three groups according to foetal heart defect type: atrioventricular defect in 104 (37.3%), conotruncal anomalies in 102 (36.5%) and LVOT in 73 (26.2%) (Table 1). Maternal characteristics and PE/IUGR risk factors [24] for each group are summarized in Table 2. No differences were found among groups.

Overall, PE occurred in 16 (5.7%) women carrying a foetus with CHD: 8 were mild (50%), 6 severe (37.5%) and 2 HELLP syndromes (11.5%). PE rates according to heart defect subgroup are shown in Table 3. A significantly higher incidence of PE was observed in the CHD group compared with the normal population (5.7% versus 1.2%; $p < 0.0001$) (OR 5.96; 95% CI: 3.19–10.54). Differences were also found between the atrioventricular valve defect and conotruncal anomaly subgroups and the normal population (7.7% versus 1.2%; $p < 0.0001$) and (5.8% versus 1.2%; $p = 0.0003$), respectively. However, no significant differences were found

Table 1. Classification and distribution of cases in the three CHD groups.

	<i>N</i>
Atrioventricular valve defects	104
Septal defects	36
Atrioventricular septal defects	19
Ebstein's anomaly	6
Tricuspid valve atresia	10
Pulmonary atresia with intact ventricular septum	20
Congenitally corrected transposition of great arteries	5
Double inlet left ventricle	8
Conotruncal anomalies	102
Transposition of the great arteries	62
Tetralogy of Fallot	23
Double-outlet right ventricle	14
Common arterial trunk	2
Aorto-pulmonary window	1
Left-ventricle outflow tract obstructions (LVOT)	73
Aortic valve stenosis	3
Coarctation of the aorta	43
Aortic Arc interruption	1
Mitral atresia	8
Hypoplastic Left syndrome	18

between the LVOT group and normal population (2.7% versus 1.2%; $p = 0.254$), nor among the different CHD groups (7.7% versus 5.8% versus 2.7%; $p = 0.376$).

With respect to birth weight percentile, CHD fetuses had significantly lower birth weights than the normal population; 21.1% and 9.7% of fetuses with CHD had <10th and 3rd birth weight percentiles, respectively, compared with 10% and 3% for the normal population (OR 3.32; 95% CI: 2.39–4.56 and OR 4.54; 95% CI: 2.84–7.04). A higher incidence of stillbirth was also observed in the CHD group compared with the normal population (2.5% versus 0.4%) (OR 9.45; 95% CI: 3.35–23.3).

Discussion

To our knowledge, this is the first study to evaluate the incidence of placental complications in women carrying a foetus with CHD. Our data show significantly higher incidences of pre-eclampsia, IUGR and stillbirth in these cases compared with the normal population.

Some studies reported that pregnant women with CHD have a higher risk of obstetric complications [19–22]. Petronella et al. described high resistance in uteroplacental blood flow throughout pregnancy in women with CHD compared with healthy women. In addition, higher incidences of obstetric and offspring complications such as pre-eclampsia (5.7%) and small-for-gestational-age fetuses (16.3%) were observed [23], which suggests a relationship between impaired placentation and CHD.

Animal studies demonstrated the implication of angiogenic factors in heart embryogenesis; a heterozygous deletion of vascular endothelial growth factor (VEGF) causes death of the embryo owing to its inability to form the vascular tree [9,27]. In zebra fish embryos, the blockage of VEGF receptors resulted in a functional and structural defect in heart valve development, suggesting that these receptors are involved in heart valve formation [5]. Placental growth factor

(PlGF) is a glycoprotein of the VEGF family, and the soluble form of fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1) is a potent antagonist of both VEGF and PlGF [28]. Reduced maternal serum PlGF at 11–13 weeks of gestation was reported in pregnancies that developed pre-eclampsia [29] and in patients with fetuses with valve and conotruncal heart defects [7]. Furthermore, decreased maternal serum PlGF and increased sFlt-1 at 18–37 weeks of gestation in these types of defect were observed [3].

The higher risk of pre-eclampsia and IUGR in these women supports the hypothesis that there may be intrinsically angiogenic impairment of both the placenta and foetal heart. A higher incidence of pre-eclampsia was observed in patients with valve and conotruncal defects, which may point to a common pathophysiological pathway leading to pre-eclampsia and some types of CHD. The origins of conotruncal and valve malformations may differ from those of the LVOT. Since LVOT defects have complex multifactorial aetiologies [7], the fact that the incidence of pre-eclampsia was not significantly higher would appear to support adequate placentation in these patients.

In our cohort, 2.5% of intrauterine foetal deaths were unexplained and 1 in 5 CDH newborns had low birth weight. Although the association of complex CHD, low birth weight and foetal death is well known [30,31], their causes remain unclear. Disease-specific biometrics are thought to be a consequence of diminished oxygen distribution and blood flow to the body caused by abnormal heart morphology in fetuses with heart defects. However, birth weight is independent of CHD severity and blood flow hemodynamics *in utero*. Furthermore, a correlation between lower maternal PlGF levels and birth weight percentile in CHD infants has been reported (REF), suggesting that placental impairment contributes to diminished growth potential of fetuses with CHD.

The study has some limitations resulting from its retrospective design. Although patients underwent

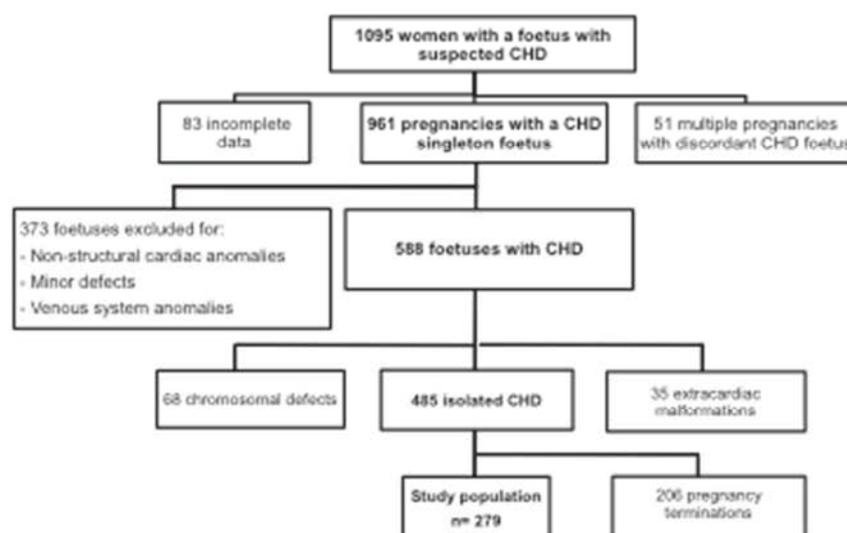


Figure 1. Flow chart of the study population according to selection criteria. CHD, congenital heart disease.

Table 2. Baseline characteristics of the congenital heart disease groups.

Parameters	A-V (n = 104)	Conotruncal (n = 102)	LVOT (n = 73)	p value
Age (years)	30.89 (0.3)	31.2 (0.2)	29.73 (0.9)	0.43
Weight (kg)	66.41 (2.5)	63.99 (3.2)	66.61 (3.2)	0.43
Height (m)	1.63 (0.1)	1.73 (0.3)	1.61 (0.2)	0.35
Body mass index (kg/m ²)	24.51 (0.2)	25.52 (0.3)	24.88 (0.5)	0.98
Caucasian	86 (82.7%)	86 (84.3%)	68 (93.1%)	4.29
Smoker	14 (13.4%)	18 (17.6%)	10 (13.5%)	0.84
Conception				
Spontaneous	99 (95.2%)	98 (96.1%)	71 (97.3%)	0.78
Assisted	5 (4.8%)	4 (3.9%)	2 (2.7%)	
Parity				
Nulliparous	46 (44.3%)	52 (51.0%)	36 (49.3%)	0.60
Parous	58 (55.7%)	50 (49.0%)	37 (50.7%)	
Chronic hypertension	1 (0.9%)	1 (0.9%)	1 (1.4%)	0.76
Diabetes I/II	1 (0.9%)	2 (1.9%)	1 (1.4%)	0.83
Obstetric history				
Previous pre-eclampsia	1 (0.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.43
Previous IUGR	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (1.4%)	0.24
Previous stillbirth	2 (1.9%)	0 (0.0%)	2 (2.7%)	0.28

A-V, atrioventricular valve defects; LVOT, left-ventricle outflow obstruction; IUGR, intrauterine growth restriction. Data are shown as mean \pm SD or percentage (n).

Table 3. Comparison of maternal and foetal outcome in cases of congenital heart disease (CHD), classified into groups according to heart defect, and with controls.

Complications	Control group (n = 6035)	Congenital heart diseases			
		All (n = 279)	Group 1 A-V (n = 104)	Group 2 conotruncal (n = 102)	Group 3 LVOT (n = 73)
Pre-eclampsia OR 5.96 (3.19-10.54)	75 (1.2%)	16 (5.7%)*	8 (7.7%)*	6 (5.8%)*	2 (2.7%)
SGA OR 3.32 (2.39-4.56)	603 (10%)	59 (21.1%)*	17 (16.3%)*	21 (20.6%)*	21 (28.8%)*
IUGR < p3 OR 4.54 (2.84-7.04)	181 (3%)	27 (9.7%)*	7 (6.7%)*	9 (8.8%)*	11 (15%)*
Stillbirth OR 9.45 (3.35-23.3)	21 (0.35%)	7 (2.5%)*	4 (3.8%)*	2 (1.9%)	1 (1.4%)

SGA, small for gestational age; IUGR, intrauterine growth restriction; A-V, atrioventricular valve defects; LVOT, left-ventricle outflow obstruction.

*p value <0.05.

**p value <0.01.

***p value <0.001 compared with controls.

echocardiographic assessment, no uterine artery Doppler indices were recorded. Furthermore, no histological information on placental characteristics was available. Doppler and histological study of the placenta might have provided some insight into the interpretation of our results. Thus, future studies seeking this information are warranted.

Conclusions

This study is the first to report a higher risk of pre-eclampsia in women carrying a foetus with CHD. Since our data suggest that these women have an increased risk of maternal and offspring-related placental complications, the relationship between CHD and placenta-related complications might constitute an encouraging hypothesis for future research.

Declaration of interest

This study was supported by research grants (07/1095 and 13/1449) from the Fondo de Investigación Sanitaria and Maternal and Child Network SAMID (RD 08/0072 and RD12/0026), financed by the Carlos III Institute of Health in Spain. The authors are grateful to Christine O'Hara for her help with the English version of the article.

References

- Ferencz C, Rubin JD, McCarter RJ, et al. Congenital heart disease: prevalence at livebirth. The Baltimore-Washington infant study. *Am J Epidemiol* 1985;121:31-6.
- Vander Linde D, Konings EEM, Slager MA, et al. Birth prevalence of congenital heart disease worldwide: a systematic review and meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2011;58:2241-7.
- Llurba E, Sánchez O, Ferrer Q, et al. Maternal and foetal angiogenic imbalance in congenital heart defects. *Eur Heart J* 2014;35:701-7.
- Miquerol L, Langille BL, Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development* 2000;127:3941-6.
- Lee YM, Cope JJ, Ackermann GE, et al. Vascular endothelial growth factor receptor signaling is required for cardiac valve formation in zebrafish. *Dev Dyn* 2006;235:29-37.
- Armstrong EJ, Bischoff J. Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res* 2004;95:459-70.
- Llurba E, Syngelaki A, Sanchez O, et al. Maternal serum placental growth factor at 11-13 weeks' gestation and foetal cardiac defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013;42:169-74.
- Shore VH, Wang TH, Wang CL, et al. Vascular endothelial growth factor, placenta growth factor and their receptors in isolated human trophoblast. *Placenta* 1997;18:657-65.
- Zeche M, Maghione D, Ribatti D. Placenta growth factor-1 is chemotactic, mitogenic, and angiogenic. *Lab Invest* 1997;76:517-31.
- Akolekar R, Syngelaki A, Sarris R, et al. Prediction of early, intermediate and late pre-eclampsia from maternal factors,

- biophysical and biochemical markers at 11-13 weeks. *Prenat Diagn* 2011;31:66-74.
11. Murphy DJ, Striate GM. Mortality and morbidity associated with early-onset preeclampsia. *Hypertens Pregnancy* 2000;19:221-31.
 12. Ahmad S, Ahmed A. Elevated placental soluble vascular endothelial growth factor receptor-1 inhibits angiogenesis in preeclampsia. *Circ Res* 2004;95:884-91.
 13. Basso O, Baird DD. Infertility and preterm delivery, birthweight, and Caesarean section: a study within the Danish National Birth Cohort. *Hum Reprod* 2003;18:2478-84.
 14. Crispi F, Llorca E, Dominguez C, et al. Predictive value of angiogenic factors and uterine artery Doppler for early- versus late-onset pre-eclampsia and intrauterine growth restriction. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;31:303-9.
 15. Crispi F, Dominguez C, Llorca E, et al. Placental angiogenic growth factors and uterine artery Doppler findings for characterization of different subsets in preeclampsia and in isolated intrauterine growth restriction. *Am J Obstet Gynecol* 2006;195:201-7.
 16. Maynard SE, Min JY, Merchan J, et al. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003;111:649-58.
 17. Wallner W, Sengenberger R, Strick R, et al. Angiogenic growth factors in maternal and fetal serum in pregnancies complicated by intrauterine growth restriction. *Clin Sci (Lond)* 2007;112:51-7.
 18. Taylor RN, Grimwood J, Taylor RS, et al. Longitudinal serum concentrations of placental growth factor: evidence for abnormal placental angiogenesis in pathologic pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 2003;188:177-82.
 19. Siu SC, Sermer M, Colman JM, et al. Prospective multicenter study of pregnancy outcomes in women with heart disease. *Circulation* 2001;104:515-21.
 20. Stangl V, Schad J, Gossing G, et al. Maternal heart disease and pregnancy outcome: a single-centre experience. *Eur J Heart Fail* 2008;10:855-60.
 21. Drenthen W, Pieper PG, Roos-Hesselink JW, et al. ZAHARA Investigators. Outcome of pregnancy in women with congenital heart disease: a literature review. *J Am Coll Cardiol* 2007;49:2303-11.
 22. Drenthen W, Boersma E, Balci A, et al. Predictors of pregnancy complications in women with congenital heart disease. *Eur Heart J* 2010;31:2124-32.
 23. Pieper PG, Balci A, Aarnoudse JG, et al. Uteroplacental blood flow, cardiac function, and pregnancy outcome in women with congenital heart disease. *Circulation* 2013;128:2478-87.
 24. Llorca E, Carreras E, Eduard Gratacós M, et al. Maternal history and uterine artery Doppler in the assessment of risk for development of early- and late-onset preeclampsia and intrauterine growth restriction. Hindawi Publishing Corporation. *Obstet Gynecol Int Vol* 2009;6: Article ID 275613.
 25. Report of the American College of Obstetricians and Gynecologists' Task Force on Hypertension. Vol 122, No. 5, November 2013.
 26. Sánchez O, Llorca E, Marsal G, et al. First trimester serum angiogenic/antiangiogenic status in twin pregnancies: relationship with assisted reproduction technology. *Human Reprod* 2012;27:358-65.
 27. Ferrara N, Caver-Moore K, Chen H, et al. Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 1996;380:439-42.
 28. Maglione D, Guerriero V, Viglietto G, et al. Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:9267-71.
 29. Akolekar R, Zaragoza E, Poon LCY, et al. Maternal serum placental growth factor at 11 + 0 to 13 + 6 weeks of gestation in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008;32:732-9.
 30. Spiers PS, Wang L. Short pregnancy interval, low birthweight, and the sudden infant death syndrome. *Am J Epidemiol* 1976;104:15-21.
 31. Rosenthal GL, Wilson PD, Permutt T, et al. Birth weight and cardiovascular malformations: a population-based study. The Baltimore-Washington Infant Study. *Am J Epidemiol* 1991;133:1273-81.

12.1.2 Estudio 2: Cambios longitudinales en las biometrías y la hemodinámica cerebroplacentaria en fetos con cardiopatía congénita.

Longitudinal changes in fetal biometry and cerebroplacental hemodynamics in fetuses with congenital heart disease

A. RUIZ*†‡#, M. CRUZ-LEMINI*†‡§#, N. MASOLLER‡, M. SANZ-CORTÉS†¶, Q. FERRER*†, I. RIBERA*†, J. M. MARTÍNEZ‡, F. CRISPI‡, S. ARÉVALO*†, O. GÓMEZ‡, S. PÉREZ-HOYOS***, E. CARRERAS*†, E. GRATACÓS‡ and E. LLURBA*†

*Department of Obstetrics, Maternal-Fetal Medicine Unit, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain; †Maternal and Child Health and Development Network II (SAMID II) RD12/0026, Institute of Health Carlos III, Madrid, Spain; ‡BCNatal - Barcelona Center for Maternal-Fetal and Neonatal Medicine (Hospital Clínic and Hospital Sant Joan de Deu), Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Universitat de Barcelona, and Centre for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBER-ER), Barcelona, Spain; §Fetal Medicine Mexico, Fetal Medicine and Surgery Research Unit, Unidad de Investigación en Neurodesarrollo, Instituto de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Campus Juriquilla, Querétaro, Mexico; ¶Maternal Fetal Medicine Department, Baylor College of Medicine, Houston, TX, USA; **Department of Statistics and Preventive Medicine, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

KEYWORDS: congenital heart disease; echocardiography; fetal biometry; fetal Doppler evaluation

ABSTRACT

Objectives To determine the longitudinal behavior of fetal biometric measures and cerebroplacental hemodynamics throughout gestation in fetuses with congenital heart disease (CHD).

Methods Fetal biometry and Doppler hemodynamics (uterine artery (UtA), umbilical artery (UA) and fetal middle cerebral artery (MCA)) were measured serially in a cohort of consecutive fetuses diagnosed with CHD. Evaluations were made at various time points, from diagnosis (20–25 weeks) to delivery, with at least two measurements per fetus that were at least 2 weeks apart. Fetuses were classified into three groups according to the pattern of blood supply to the brain (placental vs systemic) that would be expected on the basis of the type of CHD. All parameters were transformed into Z-scores. A linear mixed model to analyze repeated measurements was constructed for each parameter to assess its behavior throughout gestation.

Results Four hundred and forty-four ultrasound examinations were performed in 119 CHD fetuses, with a median of two measurements per fetus. The fetuses presented a small head at diagnosis (biparietal diameter (BPD) Z-score, -1.32 ± 0.99 ; head circumference (HC) Z-score, -0.79 ± 1.02), which remained small throughout gestation. UtA and UA pulsatility indices (PI) showed a

significant increase towards the end of pregnancy, whereas no significant changes were observed in MCA-PI or cerebroplacental ratio (CPR) with gestational age. Both MCA and CPR presented significant differences in longitudinal behavior between CHD groups, while BPD and HC did not.

Conclusions CHD fetuses have a relatively small head from the second trimester of pregnancy, regardless of the type of CHD anomaly, and increasing resistance in the UtA and UA as pregnancy progresses, suggestive of increasing degree of placental impairment. Our findings indicate the early onset of mechanisms that could lead to poorer neurodevelopment later in life. Copyright © 2016 ISUOG. Published by John Wiley & Sons Ltd.

INTRODUCTION

Congenital heart disease (CHD), a major cause of infant mortality and morbidity, occurs in approximately 6–12 per 1000 live births¹. From an obstetric viewpoint, it constitutes one of the most common congenital anomalies and accounts for approximately 8% of stillborn infants without chromosomal abnormalities². While advances in early diagnosis and postnatal management have increased survival in children with CHD³, worrying long-term outcomes, particularly neurodevelopmental disability, have emerged as a key prognostic factor in the counseling of these pregnancies^{4,5}.

Correspondence to: Dr E. Llurba, Department of Obstetrics, Maternal-Fetal Medicine Unit, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Psg. Vall d'Hebron 129–139, ES-08035, Barcelona, Spain (e-mail: elisa.llurba@vhir.org)

#A.R. and M.C.-L. contributed equally to this manuscript.

Accepted: 29 April 2016

A recent study showed that a high proportion of fetuses with CHD have a smaller head and increased brain perfusion by the second trimester of pregnancy⁶. Additionally, a substantial percentage of newborns with CHD have signs of brain injury on magnetic resonance imaging (MRI)^{5,7,8} and reduced cranial size^{9,10}, suggesting early onset of the mechanisms leading to poorer neurodevelopment later in life.

It has been hypothesized that altered cerebral perfusion is one of the main contributors to abnormal neurodevelopment in fetuses with CHD. However, although abnormal head size was more pronounced in fetuses with compromised blood delivery to the brain, it was also present in milder forms of CHD, suggesting that there could be additional mechanisms that contribute to abnormal neurodevelopment in CHD cases^{6,11}.

We have reported that maternal serum placental growth factor (PIGF) is decreased at 11–13 weeks of gestation in cases of isolated major fetal heart defects, which indicates impaired placental angiogenesis¹². Furthermore, higher antiangiogenic expression, characterized by soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), vascular endothelial growth factor A and soluble endoglin, was observed in heart tissue and cord blood of fetuses with CHD compared to controls, and lower PIGF and higher sFlt-1 levels were found in maternal serum at 18–37 weeks of gestation, thereby indicating that these cases may have altered placental angiogenesis¹³.

We sought to ascertain whether an impairment in fetal head and body growth develops throughout gestation and whether these changes are related to the expected type of oxygen brain supply in CHD cases. Moreover, we hypothesized that placental perfusion could be related to changes in fetal head and body size in cases of CHD.

SUBJECTS AND METHODS

Study population

This was a retrospective study of cases with CHD identified prenatally at one of two tertiary centers: BCNatal and Hospital Universitari Vall d'Hebrón, Barcelona, Spain. The study population consisted of pregnant women referred to the fetal cardiology units for fetal echocardiography from June 2010 to December 2014. Diagnosis of major CHD was the inclusion criterion. We considered as exclusion criteria gestational age <20 weeks or >25 weeks at referral, associated extracardiac malformation, chromosomal abnormality, associated fetal arrhythmia, maternal condition that might affect fetal hemodynamics, such as diabetes, thyroid disease or pre-eclampsia, multiple pregnancy and fetal anemia. The study protocol was approved by both hospitals' ethics committees.

Maternal age, gestational age at delivery, mode of delivery, presence of pre-eclampsia, sex, birth weight, birth-weight centile, birth length, head circumference (HC) at birth, Apgar scores and umbilical artery (UA)

pH were recorded. Birth length and HC were converted into Z-scores using published normative data¹⁴.

In order to analyze the effect of cerebral hemodynamics according to the expected main pattern of blood supply to the brain (placental (oxygenated, nutrient-rich) vs systemic (deoxygenated, nutrient-poor)) in different types of CHD, we stratified the study population, using a previously published classification^{6,11} as follows:

- Group 1: expected low placental blood content, including severe left outflow tract obstruction with reversed flow in the aortic isthmus (and thus retrograde cerebral blood perfusion from the ductus arteriosus), and transposition of the great arteries (TGA) with the aortic blood flow originating from the right ventricle.
- Group 2: expected intermediate placental and systemic blood content owing to intracardiac shunt (septal defects, conotruncal defects other than TGA and complex CHD).
- Group 3: expected high placental blood content, in which brain perfusion originated from the left ventricle via a correctly formed aorta (right CHD), including pulmonary stenosis, tricuspid atresia, Ebstein's anomaly and pulmonary atresia.

Ultrasound evaluation

Gestational age at ultrasound examination was calculated from the crown-rump length at first-trimester screening¹⁵. A complete ultrasound examination was performed in each fetus using a Voluson E8 (GE Healthcare Ultrasound, Milwaukee, WI, USA) or Siemens Sonoline Antares (Siemens Medical Systems, Malvern, PA, USA) ultrasound machine equipped with a 9–2-MHz convex curved transducer. Fetal echocardiographic examination was performed according to the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology guidelines¹⁶. Briefly, cardiac axis and situs, pericardial effusions, ventricular morphology, venoatrial, atrioventricular and ventriculoarterial connections, size and relationships of left and right ventricular outflow tracts, ductal and aortic arches, atrial and interventricular septum and flow through atrioventricular and semilunar valves were evaluated using two-dimensional, color and pulsed Doppler ultrasound. Prenatal diagnosis of CHD was confirmed on postnatal echocardiography or at autopsy in cases of neonatal death.

Fetal biometric parameters biparietal diameter (BPD), HC, abdominal circumference (AC) and femur length (FL) were assessed and transformed into centiles for gestational age^{17,18}. Estimated fetal weight was calculated according to the method of Hadlock *et al.*¹⁹; both estimated fetal weight and birth-weight centile were calculated using local reference curves²⁰. Doppler recordings were made in the absence of fetal movements with voluntarily suspended maternal breathing. Measurements of pulsed Doppler

parameters were taken automatically from three or more consecutive waveforms, with an angle of insonation as close as possible to 0°. The UA was evaluated in a free loop of the umbilical cord²¹. The fetal middle cerebral artery (MCA) was measured in a transverse view of the skull at the level of its origin from the circle of Willis²¹. Cerebroplacental ratio (CPR) was calculated by dividing MCA by UA pulsatility index (PI)²². Uterine artery (UtA) was evaluated with the probe placed on the lower quadrant of the abdomen, angled medially, with identification by color Doppler imaging of the apparent crossover with the external iliac artery. Mean UtA-PI was calculated as the average PI of right and left arteries²³. Doppler parameters were transformed into Z-scores and centiles according to their normal ranges²¹⁻²³. MCA-PI and/or CPR < 5th centile was interpreted as a sign of brain vasodilation/redistribution²². Mean UtA-PI > 95th centile²³ and UA-PI > 95th centile²¹ were considered to be abnormal.

Statistical analysis

Data were analyzed using the IBM SPSS Statistics 21 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and Stata 13.1 (StataCorp, College Station, TX, USA) statistical packages. All parameters were converted into Z-scores using published normative data from a large population of healthy fetuses^{17,18,21-23}. A Z-score of 0 was at the mean of the normal data and Z-scores of ± 1 and ± 2 were at 1 and 2 SD from the mean, respectively. Variables were expressed as mean \pm SD or percentage. Doppler indices and biometric parameters were compared among groups using one-way analysis of variance (ANOVA). To control for Type-1 error inflation, *post-hoc* pairwise comparisons among diagnostic groups were carried out, by applying a Bonferroni correction to the *P*-value of

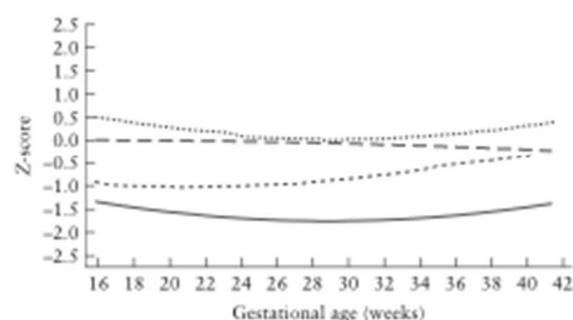


Figure 1 Longitudinal behavior of biometric parameters biparietal diameter (—), head circumference (---), abdominal circumference (.....) and femur length (-.-) in fetuses with congenital heart disease. All parameters shown as Z-scores with quadratic fit applied.

each test. Dichotomous variables were analyzed using the χ^2 -test and Fisher's exact test, with $P < 0.05$ considered statistically significant.

A linear mixed model was performed to analyze repeated measurements, with a quadratic trend component for gestational age included in the fixed effect. A random intercept and slope were included in the random-effect component. CHD grouping variables were included in the model and tested for interaction. Fixed-effect predictions were plotted against gestational weeks for better readability.

RESULTS

Four hundred and forty-four observations were recorded for 119 fetuses with CHD, with a median of two (range,

Table 1 Characteristics of study group of 119 fetuses with congenital heart disease, classified according to expected pattern of blood supply to the brain

Parameter	Group 1 (n=64)	Group 2 (n=35)	Group 3 (n=20)	All (n=119)	P*
Maternal age (years)	33 \pm 5	32 \pm 6	32 \pm 6	32 \pm 5	0.230
GA at delivery (weeks)	39.2 \pm 1.6	39.0 \pm 1.7	39.3 \pm 1.8	39.1 \pm 1.6	0.669
Mode of delivery					0.129
Spontaneous vaginal	36 (56.3)	18 (51.4)	13 (65.0)	67 (56.3)	
Forceps	15 (23.4)	4 (11.4)	4 (20.0)	23 (19.3)	
Cesarean section	13 (20.3)	13 (37.1)	3 (15.0)	29 (24.4)	
Pre-eclampsia	3 (4.7)	2 (5.7)	1 (5.0)	6 (5.0)	0.975
Male sex	39 (60.9)	16 (45.7)	13 (65.0)	68 (57.1)	0.253
Birth weight (g)	3243 \pm 613	3037 \pm 570	3062 \pm 577	3153 \pm 598	0.202
Birth-weight centile	47 \pm 36	41 \pm 32	36 \pm 34	44 \pm 35	0.424
Birth length (cm)	50.2 \pm 2.4	48.8 \pm 3.0	49.2 \pm 4.1	49.6 \pm 2.9	0.085
Birth-length Z-score	0.39 \pm 1.14	-0.26 \pm 1.45	-0.05 \pm 2.00	0.13 \pm 1.42	0.085
Birth HC (cm)	33.4 \pm 1.5	33.6 \pm 1.7	33.6 \pm 1.6	33.5 \pm 1.5	0.798
Birth HC Z-score	-0.63 \pm 1.14	-0.49 \pm 1.31	-0.46 \pm 1.27	-0.56 \pm 1.21	0.798
5-min Apgar score < 7	3 (4.7)	1 (2.9)	0 (0)	4 (3.4)	0.599
UA pH < 7.10	1 (1.6)	2 (5.7)	0 (0)	3 (2.5)	0.338

Data are given as mean \pm SD or n (%). Group 1: expected low placental blood content; Group 2: expected intermediate placental and systemic blood content; Group 3: expected high placental blood content. Small-for-gestational age defined as birth weight < 10th centile. *Analysis of variance (ANOVA) with *post-hoc* Bonferroni correction for pairwise comparisons. GA, gestational age; HC, head circumference; UA, umbilical artery.

2–9) measurements for each. Delivery data for the study group are summarized in Table 1.

Distribution of CHD types according to expected pattern of blood supply to the brain is shown in Table 2. There were 64 (53.8%) fetuses with an expected low placental blood content (Group 1), 35 (29.4%) with an expected intermediate placental and systemic blood content (Group 2) and 20 (16.8%) with expected high placental blood content (Group 3).

Comparison of biometric and Doppler parameters at the first examination in all 119 cases of CHD, classified into groups according to the expected pattern of brain blood supply, is shown in Table 3. No significant differences were observed among groups with respect to gestational age at first ultrasound, estimated fetal weight and weight centile. CHD fetuses presented a small head (BPD Z-score, -1.32 ± 0.99 , 9th centile; HC Z-score, -0.79 ± 1.02 , 21st centile) but normal AC (Z-score, 0.49 ± 0.88 , 69th centile) and FL (Z-score, -0.04 ± 0.49 , 48th centile) at diagnosis. In 38% and in 25% of cases, respectively, BPD and HC were below the 5th centile. Biometric variables at inclusion showed no significant differences among groups, with the exception of AC Z-score, which was higher in Group 3 compared with Group 2 ($P = 0.009$). Doppler parameters were within normal range in CHD fetuses in the second trimester: UA-PI Z-score (-0.45 ± 0.65 , 33rd centile), MCA-PI Z-score (-0.36 ± 1.28 , 36th centile), CPR Z-score (-0.29 ± 1.37 , 39th centile) and UtA-PI Z-score (0.17 ± 2.20 , 57th centile). However, 18% of CHD cases presented MCA-PI and CPR values below the

Table 2 Distribution of types of congenital heart disease (CHD) in study population of 119 affected fetuses, according to expected pattern of blood supply to the brain

CHD group/type of CHD	n
Group 1: Expected low placental blood content	64
Transposition of the great arteries	33
Coarctation of the aorta	21
Aortic stenosis	5
Hypoplastic left heart syndrome	4
Shone syndrome	1
Group 2: Expected intermediate placental and systemic blood content	35
Tetralogy of Fallot	13
Atrioventricular septal defect	6
Double-outlet right ventricle	4
Double-inlet single ventricle	2
Interventricular septal defect	3
Isomerism	3
Truncus arteriosus	2
Double outlet right ventricle + mitral atresia	1
Double inlet single ventricle + hypoplastic aortic arch	1
Group 3: Expected high placental blood content	20
Pulmonary stenosis	8
Tricuspid atresia	7
Ebstein's anomaly	4
Pulmonary atresia	1

5th centile at the first examination. When these parameters were analyzed according to the type of brain blood supply, UtA-PI and UA-PI showed no differences among groups; however, MCA-PI Z-score and CPR Z-score were significantly lower in the impaired brain blood supply

Table 3 Comparison of biometric and Doppler parameters at first ultrasound examination (US) in fetuses with congenital heart disease, classified into groups according to expected pattern of blood supply to the brain

Parameter	Group 1 (n = 64)	Group 2 (n = 35)	Group 3 (n = 20)	All (n = 119)	P*
GA at US (weeks)	24.0 ± 4.3	22.5 ± 3.1	23.9 ± 4.5	23.6 ± 4.1	0.176
EFW (g)	769 ± 626	589 ± 366	759 ± 494	717 ± 546	0.307
EFW centile	20 ± 28	15 ± 29	25 ± 30	19 ± 28	0.529
Biometric variables					
BPD (mm)	58.1 ± 12.0	54.4 ± 10.5	57.6 ± 12.6	56.9 ± 11.7	0.315
HC (mm)	210.7 ± 43.1	199.0 ± 36.6	207.2 ± 43.3	207.7 ± 41.3	0.408
AC (mm)	193.8 ± 45.8	172.7 ± 33.8	191.3 ± 41.7	187.1 ± 42.6	0.056
FL (mm)	41.9 ± 10.7	37.9 ± 8.9	40.8 ± 10.9	40.6 ± 10.3	0.190
BPD Z-score	-1.41 ± 0.92	-1.27 ± 1.03	-1.10 ± 1.15	-1.32 ± 0.99	0.467
HC Z-score	-0.90 ± 0.99	-0.61 ± 0.98	-0.72 ± 1.16	-0.79 ± 1.02	0.395
AC Z-score	0.56 ± 0.91	0.15 ± 0.77	0.87 ± 0.75‡	0.49 ± 0.88	0.009
FL Z-score	-0.04 ± 0.47	-0.08 ± 0.54	0.02 ± 0.52	-0.04 ± 0.49	0.743
Doppler variables					
UA-PI	1.17 ± 0.20	1.25 ± 0.18	1.16 ± 0.15	1.18 ± 0.19	0.206
MCA-PI	1.59 ± 0.32	1.74 ± 0.23	2.08 ± 0.51‡‡	1.72 ± 0.39	< 0.001
CPR	1.38 ± 0.44	1.45 ± 0.32	1.81 ± 0.55‡	1.48 ± 0.47	0.008
UtA-PI	1.62 ± 4.39	1.04 ± 0.27	1.06 ± 0.13	1.37 ± 3.29	0.742
UA-PI Z-score	-0.47 ± 0.68	-0.39 ± 0.67	-0.45 ± 0.55	-0.45 ± 0.65	0.888
MCA-PI Z-score	-0.83 ± 1.09	-0.21 ± 0.89	0.75 ± 1.50‡‡	-0.36 ± 1.28	< 0.001
CPR Z-score	-0.62 ± 1.40	-0.31 ± 1.11	0.65 ± 1.19‡‡	-0.29 ± 1.37	0.007
UtA-PI Z-score	0.23 ± 2.83	0.03 ± 1.09	0.25 ± 0.46	0.17 ± 2.20	0.936

Data are given as mean ± SD. Group 1: expected low placental blood content; Group 2: expected intermediate placental and systemic blood content; Group 3: expected high placental blood content. *Analysis of variance (ANOVA) with *post-hoc* Bonferroni correction for pairwise comparisons. †P-value < 0.05 with respect to Group 1. ‡P-value < 0.05 with respect to Group 2. AC, abdominal circumference; BPD, biparietal diameter; CPR, cerebroplacental ratio; EFW, estimated fetal weight; FL, femur length; GA, gestational age; HC, head circumference; MCA, fetal middle cerebral artery; PI, pulsatility index; UA, umbilical artery; UtA, uterine artery.

Table 4 Summary of linear mixed models for repeated measures of biometric and Doppler parameters in fetuses with congenital heart disease

Variable	Fixed part			Random part	
	Intercept (Z-score)	GA (weeks) (Z-score)	GA (weeks) ² (Z-score)	Within patient (SE)	Residual (SE)
BPD					
Estimate (95% CI)	-1.7413 (-2.1813; -1.3014)	0.0729 (0.0063; 0.1394)	-0.0026 (-0.0049; -0.0004)	0.74 (0.06)	0.61 (0.03)
P	—	0.0318	0.0204		
HC					
Estimate (95% CI)	-1.5664 (-2.0304; -1.1025)	0.1222 (0.0519; 0.1925)	-0.0035 (-0.0059; -0.0012)	0.77 (0.06)	0.64 (0.03)
P	—	0.0007	0.0032		
AC					
Estimate (95% CI)	0.2758 (-0.1885; 0.7402)	0.0403 (-0.0312; 0.1118)	-0.0016 (-0.0040; 0.0007)	0.62 (0.05)	0.66 (0.03)
P	—	0.2691	0.1779		
FL					
Estimate (95% CI)	-0.4649 (-0.8238; -0.1060)	0.0821 (0.0266; 0.1375)	-0.0033 (-0.0051; -0.0014)	0.44 (0.04)	0.52 (0.02)
P	—	0.0037	0.0005		
UA-PI					
Estimate (95% CI)	-1.6915 (-2.1316; -1.2515)	0.1956 (0.1312; 0.2600)	-0.0052 (-0.0073; -0.0031)	0.41 (0.04)	0.51 (0.02)
P	—	<0.001	<0.001		
MCA-PI					
Estimate (95% CI)	0.2517 (-0.6798; 1.1832)	-0.0815 (-0.2226; 0.0596)	0.0035 (-0.0011; 0.0081)	0.76 (0.09)	1.06 (0.05)
P	—	0.2577	0.1319		
CPR					
Estimate (95% CI)	0.3932 (-0.5829; 1.3693)	-0.1133 (-0.2611; 0.0345)	0.0038 (-0.0010; 0.0086)	0.78 (0.09)	1.02 (0.05)
P	—	0.1330	0.1164		
Mean Uterine-PI					
Estimate (95% CI)	-1.6565 (-2.5102; -0.8028)	0.1970 (0.0590; 0.3351)	-0.0027 (-0.0074; 0.0019)	1.05 (0.10)	0.78 (0.05)
P	—	0.0052	0.2503		

AC, abdominal circumference; BPD, biparietal diameter; CPR, cerebroplacental ratio; FL, femur length; GA, gestational age; HC, head circumference; MCA, fetal middle cerebral artery; PI, pulsatility index; SE, standard error; UA, umbilical artery; Uterine artery.

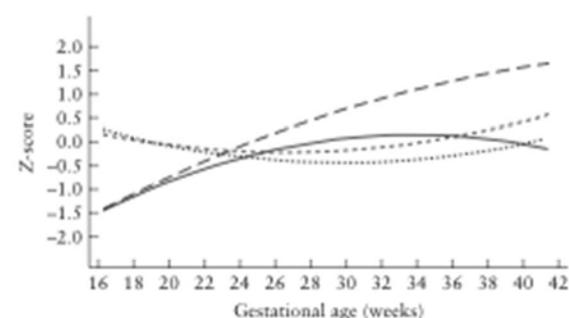


Figure 2 Longitudinal behavior of Doppler parameters umbilical artery pulsatility index (PI) (—), middle cerebral artery PI (·····), cerebroplacental ratio (-----) and mean uterine artery PI (- - -) in pregnancies with fetal congenital heart disease. All parameters shown as Z-scores with quadratic fit applied.

groups (Groups 1 and 2) ($P < 0.001$ and $P = 0.007$, respectively).

Results of the linear mixed models for repeated measurements of biometric and Doppler parameters in CHD fetuses are shown in Table 4. No differences

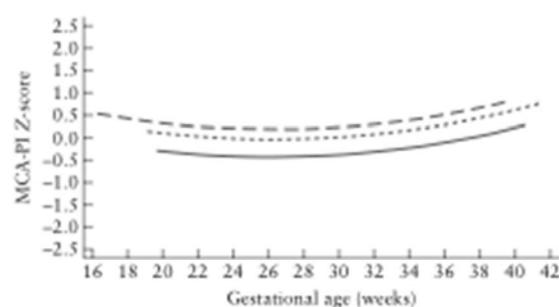


Figure 3 Longitudinal behavior of middle cerebral artery pulsatility index (MCA-PI) in fetuses with congenital heart disease, classified into groups according to expected pattern of brain blood supply. Group 1: low placental blood content (—); Group 2: intermediate placental and systemic blood content (·····); Group 3: high placental blood content (-----). Data shown as MCA-PI Z-score with quadratic fit applied.

among study groups were observed in the longitudinal analysis of head or body biometrics throughout gestation. Figure 1 shows the longitudinal behavior of biometric parameters in fetuses with CHD; 444 observations

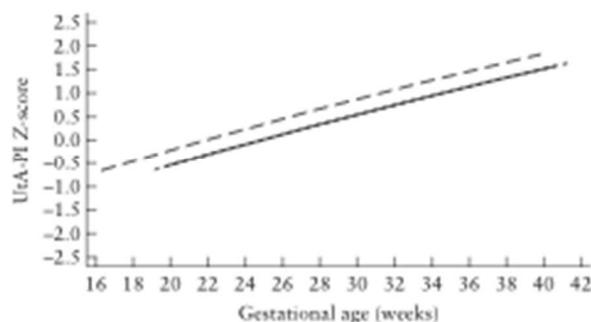


Figure 4 Longitudinal behavior of mean uterine artery pulsatility index (UtA-PI) in fetuses with congenital heart disease, classified into groups according to expected pattern of brain blood supply. Group 1: low placental blood content (—); Group 2: intermediate placental and systemic blood content (· · · · ·); Group 3: high placental blood content (---). Data shown as UtA-PI Z-score with quadratic fit applied.

were recorded in 119 fetuses. The small head at diagnosis in CHD fetuses remained small throughout gestation (Figure 1) and was confirmed at birth (HC Z-score, -0.56 ± 1.21 , 31st centile).

Figure 2 shows the longitudinal behavior of Doppler variables; 391 observations were recorded in 119 fetuses. Both UA-PI and UtA-PI Z-scores showed quadratic increases with gestational age, which were more pronounced in the UtA Doppler. At the end of pregnancy, 61% of these women showed a mean UtA-PI above the 95th centile. In contrast, MCA-PI and CPR Z-scores showed a non-significant trend towards increasing with gestation.

Comparison of MCA-PI Z-scores in the three CHD groups throughout gestation is shown in Figure 3. MCA-PI Z-scores were lower in the group with an expected severe impairment of blood supply to the brain (Group 1) ($P = 0.02$). No differences were observed when analyzing behavior of this parameter with gestational age among the three CHD groups. Comparison of UtA-PI Z-scores in the three CHD groups throughout gestation is shown in Figure 4. UtA-PI Z-scores were higher in the group with the expected best blood supply to the brain (Group 3), with all groups showing a significant quadratic increase with gestational age ($P = 0.005$).

DISCUSSION

Our data confirm that CHD fetuses have relatively small head biometry in the second trimester of pregnancy, reflected by low BPD and HC Z-scores. The main observations of this study were that head biometry remained smaller than normal throughout gestation and that placental hemodynamics showed impairment towards the end of pregnancy, regardless of the type of CHD anomaly.

CHD is associated with a relatively high prevalence of brain lesions on neuroimaging and a significant risk of

neurodevelopmental delay. Although the association of complex CHD and abnormal neurodevelopment is well established⁵, the causes remain unclear. Disease-specific biometry is thought to be a consequence of diminished oxygen distribution and blood flow to the brain caused by abnormal heart morphology in fetuses with heart defects. A direct link between reduced cerebral oxygenation and impaired brain growth in fetuses with CHD was established recently using phase-contrast cardiac magnetic resonance²⁴. We have reported that, in the third trimester of pregnancy, CHD fetuses presented significant changes in head biometry, brain perfusion, cortical development and brain metabolism, with signs of more severe alterations in cases with an expected severe reduction in brain oxygenated blood supply¹¹. Although an association between decreasing MCA-PI and CPR values with the type of CHD based on the expected degree of oxygenation was observed, all CHD groups had smaller head biometry compared with published normal data¹⁴, confirming data from previous studies^{6,25}. Interestingly, our study demonstrated that these changes persisted towards the end of pregnancy and did not worsen with advancing gestational age, thereby suggesting that the cause of abnormal brain development could already be present from the beginning of pregnancy.

One interesting finding of our present study was that UA-PI and UtA-PI worsened towards the end of pregnancy, with 61% of cases showing a mean UtA-PI above the 95th centile, indicating increased resistance in UtA vessels, suggesting a certain degree of placental impairment. Abnormal placentation was recently found to be related to CHD^{12,13}. Pregnant women with CHD have significantly more obstetric and offspring complications than do healthy women. Moreover, significantly higher incidences of pre-eclampsia, intrauterine growth restriction and stillbirth in mothers carrying a fetus with CHD were reported compared with the normal population²⁶. In our present study, 5% of women developed pre-eclampsia and approximately 50% of newborns with CHD had a birth weight below the 5th centile. Changes in plasma concentrations of angiogenic and antiangiogenic factors or their ratios in the mother imply a higher risk of her delivering a small-for-gestational-age neonate and/or developing pre-eclampsia²⁷⁻²⁹. Reduced maternal serum PIGF and increased sFlt-1 have been reported in patients with fetuses with valve and conotruncal heart defects^{12,13}. Furthermore, a correlation between lower maternal PIGF levels and birth-weight percentile in CHD infants has been reported¹³, suggesting that placental impairment contributes to diminished growth potential in fetuses with CHD. Using phase-contrast cardiac magnetic resonance, lower oxygen saturation in the umbilical vein of fetuses with CHD, which may reflect abnormal placental function, was reported recently^{24,30}. High incidences of placental abnormalities have been observed on pathology and histopathology³¹. Overall, these studies suggest that CHD may be associated with intrinsically altered placentation that is more pronounced at the end of pregnancy,

with ensuing placental hypoxia. Currently, it is not routine to screen for pre-eclampsia or placental impairment in women with a CHD fetus. Based on the results of this study, we would recommend periodic ultrasound examination for fetal growth and Doppler evaluation, as well as screening for maternal pre-eclampsia, as part of the prenatal follow-up.

Different pathogenic pathways leading to prenatal abnormal brain development in CHD, other than abnormal heart anatomy, may also exist. Alternatively, there might be an intrinsically abnormal vessel formation. Donofrio and Massaro⁴ stated that the difference between brain lesions in neonates with CHD and in those who sustained hypoxic ischemic injury suggested that acquired brain injury in CHD may be related to an abnormality in brain development. Licht *et al.*³², using a maturation score based on four parameters, including myelination, cortical infolding, involution of glial cell migration bands and the presence of germinal matrix tissues, found a delay in brain development *in utero* of approximately 1 month. Beca *et al.*³³ reported recently that severity of brain immaturity at birth predicts the level of neurodevelopmental impairment at 2 years of age after cardiac surgery. It has been hypothesized that altered brain development due to CHD may increase vulnerability to perioperative hemodynamic instability and intraoperative brain injury due to hypoxia and ischemia³⁴. Our findings show that low birth weight is at the expense of HC and BPD, with the AC remaining within normal ranges and stable throughout gestation, indicating that placental insufficiency is not the main contributor, but rather a co-existing pathological feature of common angiogenic impairment that may explain abnormal vessel formation as a common pathway in all CHD fetal systems, including the heart, brain and placenta.

Some limitations of this study should be considered. First, owing to the retrospective nature of the study, Doppler parameters were not obtained for all patients. Second, small head size on its own does not necessarily equate to neurodevelopmental delay; thus, as we did not evaluate neurodevelopment in these children, we can only speculate as to a possible relationship between a small head and neurodevelopmental delay. However, it has been demonstrated that fetal brain Doppler and cephalic biometry at the time of CHD diagnosis are independent predictors of abnormal brain development at birth, emphasizing the predictive value of these findings²⁵. Third, despite the large number of examinations and cases included in the study, the sample size of each subgroup may still be too limited to draw meaningful conclusions. Also, cases in our study with more severe types of CHD, such as hypoplastic left heart syndrome, were few, which could be considered as a conservative bias; thus, the inclusion of severe cases could have increased the differences observed in CHD cases.

In conclusion, fetuses with CHD had a small head from the second trimester onwards that remained smaller than normal throughout pregnancy, and there was a significant

trend towards increased resistance in the UtA and UA. This may indicate a coexistent neurodevelopmental abnormality associated with CHD and a certain degree of placental impairment. Our data confirm the early onset of mechanisms leading to poorer neurodevelopment later in life and suggest a window of opportunity for the prediction and prevention of abnormal neurodevelopment in cases of fetal CHD.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by research grants from Instituto de Salud Carlos III (PI12/02230, 07/1095, PI12/02230, PI13/1449 and PI15/00263), Fondo Europeo de Desarrollo Regional de la Unión Europea 'Una manera de hacer Europa' (FEDER) and the Maternal and Child Network SAMID (RD 08/0072 and RD12/0026). The research leading to these results has received funding from 'La Caixa' Foundation and Cerebra Foundation for the Brain Injured Child (Carmarthen, Wales, UK).

We are grateful to Christine O'Hara for her help with the English revision of this paper.

REFERENCES

- Donofrio MT, Moon-Grady AJ, Hoenberger LK, Coppel JA, Skendzel MS, Abuhamad A, Caron BF, Hixson JC, Jonas RA, Krahnson A, Lacey S, Lee W, Michelkeller EC, Sr, Rempel GR, Silverman NH, Spray TL, Strasburger JF, Tworetzky W, Rychik J. American Heart Association Adults With Congenital Heart Disease Joint Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young and Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and Council on Cardiovascular and Stroke Nursing. Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2014; 129: 2113–2242.
- Moon P, Szlymon T, De Wolf D, Massin M, Sorys B, Benatar A, Gewillig M. Congenital heart disease in 111 225 births in Belgium: birth prevalence, treatment and survival in the 21st century. *Acta Paediatr* 2009; 98: 472–477.
- Bakiler AR, Ozer EA, Karik A, Kamin H, Akras FN. Accuracy of prenatal diagnosis of congenital heart disease with fetal echocardiography. *Fetal Diagn Ther* 2007; 22: 241–244.
- Donofrio MT, Massaro AN. Impact of congenital heart disease on brain development and neurodevelopmental outcome. *Int J Pediatr* 2010; 2010: pii: 359390.
- Khalil A, Sull N, Thilaganathan B, Hurrell A, Cooper D, Carvalho JS. Brain abnormalities and neurodevelopmental delay in congenital heart disease: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014; 43: 14–24.
- Masoller N, Martinez JM, Gomez O, Benassar M, Crespi F, Sano-Cortes M, Egana-Ugrinovic G, Bartrons J, Puerto B, Gratacos E. Evidence of second-trimester changes in head biometry and brain perfusion in fetuses with congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2014; 44: 182–187.
- Miller SP, McQuillen FS, Hameck S, Xu D, Glidden DV, Charlton N, Karl T, Azakie A, Ferrero DM, Burkovich AJ, Vigneron DB. Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease. *N Engl J Med* 2007; 357: 1928–1938.
- Mahlé WT, Tavani F, Zimmerman RA, Nicolson SC, Galik KK, Gaynor JW, Clancy RR, Montenegro LM, Spray TL, Chiavacci RM, Wernovsky G, Kurth CD. An MRI study of neurological injury before and after congenital heart surgery. *Circulation* 2002; 106: 109–114.
- Hinton RB, Andelfinger G, Sekar P, Hinton AC, Gendron RL, Michelkeller EC, Robitaille Y, Benson DW. Prenatal head growth and white matter injury in hypoplastic left heart syndrome. *Pediatr Res* 2008; 64: 364–369.
- Shillingford AJ, Imzhaeh RF, Marano BS, Rychik J, Clancy RR, Spray TL, Gaynor JW, Wernovsky G. Aortic morphometry and microcephaly in hypoplastic left heart syndrome. *Cardiol Young* 2007; 17: 189–195.
- Masoller N, Sano-Cortes M, Crespi F, Gomez O, Benassar M, Egana-Ugrinovic G, Bartrons J, Martinez JM, Gratacos E. Severity of fetal brain abnormalities in congenital heart disease in relation to the main expected pattern of in utero brain blood supply. *Fetal Diagn Ther* 2016; 39: 269–278.
- Llurba E, Syngelaki A, Sanchez O, Carreras E, Cabero L, Nicolaidis KH. Maternal serum placental growth factor at 11–13 weeks' gestation and fetal cardiac defects. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; 42: 169–174.
- Llurba E, Sanchez O, Ferrer Q, Nicolaidis KH, Ruiz A, Dominguez C, Sanchez-de-Tolado J, Garcia-Garcia B, Soro G, Arevalo S, Goya M, Suy A, Perez-Hoyos S, Alijotas-Reig J, Carreras E, Cabero L. Maternal and fetal angiogenic imbalance in congenital heart defects. *Eur Heart J* 2014; 35: 701–707.
- Carrascosa A, Fernandez JM, Fernandez C, Fernandez A, Lopez-Sigüero JP, Sanchez E, Sobradillo B, Yeste D. Spanish growth studies 2008. New anthropometric standards. *Endocrinol Nutr* 2008; 55: 484–506.

15. Robinson HP, Sweet EM, Adams AH. The accuracy of radiological estimates of gestational age using early fetal crown-rump length measurements by ultrasound as a basis for comparison. *Br J Obstet Gynaecol* 1979; **86**: 525-528.
16. International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology, Carvalho JS, Allan LD, Charoui R, Copel JA, DeVore GR, Hecher K, Lee W, Miano H, Paladini D, Tuschek B, Yagel S. ISUOG Practice Guidelines (updated): sonographic screening examination of the fetal heart. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2013; **41**: 348-359.
17. Kurmanavicius J, Wright EM, Royston P, Wisser J, Hoch R, Hoch A, Zimmermann R. Fetal ultrasound biometry: 1. Head reference values. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; **106**: 126-135.
18. Kurmanavicius J, Wright EM, Royston P, Zimmermann R, Hoch R, Hoch A, Wisser J. Fetal ultrasound biometry: 2. Abdomen and femur length reference values. *Br J Obstet Gynaecol* 1999; **106**: 136-143.
19. Hadlock FP, Harrist RB, Shoh YP, King DE, Park SK, Shamon RS. Estimating fetal age using multiple parameters: a prospective evaluation in a racially mixed population. *Am J Obstet Gynecol* 1987; **156**: 955-957.
20. Figueras F, Miler E, Iraola A, Eixarch E, Coll O, Figueras J, Francis A, Gratacos E, Gardon J. Customized birthweight standards for a Spanish population. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008; **136**: 20-24.
21. Ardiziani D, Rizzo G. Normal values of Pulsatility Index from fetal vessels: a cross-sectional study on 1556 healthy fetuses. *J Perinat Med* 1999; **18**: 165-172.
22. Baschat AA, Gembruch U. The cerebroplacental Doppler ratio revisited. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2003; **21**: 124-127.
23. Gomez O, Figueras F, Fernandez S, Benassar M, Martinez JM, Puerto B, Gratacos E. Reference ranges for uterine artery mean pulsatility index at 11-41 weeks of gestation. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; **32**: 128-132.
24. Sun L, Macgowan CK, Skel JG, Yoo SJ, Manihot C, Porayette P, Grosse-Wortmann L, Jaeggi E, McCrindle BW, Kingdom J, Hickey E, Miller S, Seed M. Reduced fetal cerebral oxygen consumption is associated with smaller brain size in fetuses with congenital heart disease. *Circulation* 2015; **131**: 1313-1323.
25. Masoller N, Sarri-Cortes M, Crisp F, Gomez O, Benassar M, Egana-Ugrinovic G, Bargallo N, Martinez JM, Gratacos E. Mid-gestation brain Doppler and head biometry in fetuses with congenital heart disease predict abnormal brain development at birth. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2016; **47**: 65-73.
26. Ruiz A, Ferrer Q, Sanchez O, Ribera I, Acevedo S, Alonso O, Mendoza M, Cabero L, Carreras E, Llorca E. Placenta-related complications in women carrying a fetus with congenital heart disease. *J Mater Fetal Neonatal Med* 2016; **29**: 3271-3275.
27. Maynard SE, Min JY, Merchan J, Lim KH, Li J, Mondul S, Liberman TA, Moegan JP, Selke FW, Stillman RE, Epstein FH, Sukhrieve VP, Karumanchi SA. Excess placental soluble fms-like tyrosine kinase 1 (sFlt1) may contribute to endothelial dysfunction, hypertension, and proteinuria in preeclampsia. *J Clin Invest* 2003; **111**: 649-658.
28. Zeidel H, Llorca E, Chartraine F, Varsh M, Staff AC, Sorenstrom M, Olsson M, Brennecke SP, Stepan H, Allegranza D, Dalbi F, Schoedl M, Hurd M, Verloren S. Predictive value of the sFlt1:PlGF ratio in women with suspected preeclampsia. *N Engl J Med* 2016; **374**: 13-22.
29. Akolekar R, Zaragosa E, Poon LC, Pope S, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor at 11+0 to 13+6 weeks of gestation in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol* 2008; **32**: 732-739.
30. Porayette P, Madhul S, Sun L, Jaeggi E, Grosse-Wortmann L, Yoo SJ, Hickey E, Miller SP, Macgowan CK, Seed M. MRI reveals hemodynamic changes with acute maternal hypoxoxygenation in human fetuses with and without congenital heart disease. *Prenat Diagn* 2016; **36**: 274-281.
31. Goff D, McKay EM, Davey BT, Thacker D, Khalek N, Mienik SR, Moldenhauer JS, Hall DS, Rychik J. Abstract 11260: Placental abnormalities in fetal congenital heart disease. *Circulation* 2011; **124**: A11260.
32. Licht DJ, Shera DM, Clancy RR, Wernovsky G, Montenegro LM, Nicolson SC, Zimmermann RA, Spray TL, Gaynor JW, Vossough A. Brain maturation is delayed in infants with complex congenital heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2009; **137**: 529-536.
33. Boca J, Gern JK, Coleman L, Hope A, Reed PW, Hunt RW, Finocane K, Brizard C, Dance B, Shekerdemian LS. New white matter brain injury after infant heart surgery is associated with diagnostic group and the use of circulatory arrest. *Circulation* 2013; **127**: 971-979.
34. Gaynor JW, Stopp C, Wypij D, Andropoulos DB, Atallah J, Atz AM, Ecca J, Donofrio MT, Duncan K, Ghanayem NS, Goldberg CS, Hovel-Gurich H, Ichida F, Jacobs JP, Justo R, Latal B, Li JS, Mahle WT, McQuillen PS, Menon SC, Penberton VL, Pike NA, Pizarro C, Shekerdemian LS, Spence A, Williams I, Bellinger DC, Newburger JW. International Cardiac Collaborative on Neurodevelopment I. Neurodevelopmental outcomes after cardiac surgery in infancy. *Pediatrics* 2015; **135**: 816-825.

12.1.3 Estudio 3: Expresión cerebral de distintos genes angiogénicos en las cardiopatías congénitas.

Brain angiogenic gene-expression in congenital heart disease

Short title: Brain Angiogenesis in CHD

Olga Sánchez ^{a, b}, PhD, BSc; Aina Ruiz-Romero ^c, MD; Carmen Domínguez ^{b, d}, PhD, BSc; Queralt Ferrer^e, MD; MD Irene Ribera ^c, Jaume Alijotas ^{f, g} PhD, MD; Silvia Arevalo^c, MD; Lluís Cabero ^{a, c, g}, PhD, MD; Elena Carreras ^{a, c}, PhD, MD; Elisa Llurba ^{a, c, g}, PhD, MD*.

^a Vall d'Hebron Institute of Research (VHIR), Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain, SAMID Network Ref. RD12/0026/0016.

^b Biochemistry and Molecular Biology Research Centre for Nanomedicine , Vall d'Hebron Research Institute, 08035 Barcelona, Spain.

^c Maternal-Fetal Medicine Unit, Department of Obstetrics, Vall d'Hebron University Hospital, Spain.

^d Center for Biomedical Research on Rare Diseases (CIBERER), 08028 Barcelona, Spain.

^e Pediatric Cardiology Unit, Department of Pediatrics, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

^f Department of Internal Medicine, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

^g School of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain.

Abstract

Rationale: Neurodevelopmental impairment has emerged as a key prognostic factor in the counseling of parents facing a pregnancy with a congenital heart disease (CHD) fetus. Increasing evidence support prenatal appearance of mechanisms that lead to poor neurodevelopmental outcome. Angiogenic unbalance has emerged as a possible contributor pathway in the pathogenesis of CHD.

Objective: To analyze if differences exists in the expression of antiangiogenic and angiogenic factors as well as the genes of chronic hypoxia in cerebral tissue of euploid CHD compared to control fetuses.

Methods and Results: Gene expression profile was determined by real-time PCR quantification in brain tissue from 2 different areas: frontal cortex and basal ganglia and hypothalamus, obtained from 15 CHD and 12 control fetuses undergoing termination of pregnancy. Both antiangiogenic/angiogenic factor mRNA expressions were significantly increased in the CHD group compared to controls in frontal cortex (soluble fms-like tyrosine kinase-1(sFlt-1), 48%, $p=0.0431$) and in basal ganglia and hypothalamus (sFlt-1, 72%, $p=0.0369$ and vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), 60%, $p=0.0432$). Significant increases in the transcript level of hypoxia-inducible factor-2 α (HIF-2 α) were also observed in the basal ganglia/hippocampus area in the CHD group compared to controls.

Conclusion: An overall dysregulation of angiogenesis with a net balance towards an anti-angiogenic environment was observed in the cerebral tissue from fetuses with CHD, suggesting that CHD cases have an intrinsically-angiogenic impairment that could contribute to impaired brain perfusion and abnormal neurological development later in life.

Congenital heart disease; angiogenesis; hypoxia.

Nonstandard Abbreviations and Acronyms	
CHD	congenital heart disease
mRNA	messenger RNA
sFlt-1	soluble fms-like tyrosine kinase 1
VEGF-A	vascular endothelial growth factor A
HIF	hypoxia inducible factor
PlGF	placental growth factor
sEng	soluble endoglin
DS	Down syndrome
TF	tetralogy of fallot
Ftl-1	fms related tyrosine kinase 1
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
POL2A	RNA polymerase II subunit A
IUGR	intrauterine growth restriction
HLHS	hypoplastic left heart syndrome
TGA	transposition of the great arteries

Introduction

Congenital heart diseases (CHD) occur in approximately 6-12 per 1000 live births¹. Advances in cardiac surgery and neonatal care have significantly increased survival²; however, these children frequently suffer from a broad spectrum of subsequent neurological deficits, including motor, cognitive, behavioral, social, and attention abnormalities³⁻⁵.

Neurodevelopmental delay in children with CHD was explained as a consequence of haemodynamic oxygen underperfusion during cardiac surgery^{6, 7}. However, recent studies showed that a high proportion of fetuses with CHD already have a signs of neurological damage before birth⁸⁻¹², suggesting an early onset of the mechanisms leading to poorer neurodevelopment later in life.

More recently, it has been hypothesized that, during fetal life, abnormal heart morphology alters blood flow resulting in delivery of desaturated blood to the brain causing a certain degree of cerebral hypoxia¹²⁻¹⁸. However, prenatal signs of increased risk of neurological impairment have been also described in fetuses with a correct or optimal oxygen brain supply, pointing out that other pathologic contributions may also be present.

The relation between abnormal angiogenic profile and heart defects has been recently described. We reported that maternal serum placental growth factor (PlGF) was decreased at 11–13 weeks of gestation in isolated major fetal heart defects, which indicates impaired placental angiogenesis¹⁹. Furthermore, higher anti-angiogenic expression characterized by soluble fms-like tyrosine kinase-1 (sFlt-1), vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) and soluble endoglin (sEng) was observed in heart tissue and cord blood of fetuses with CHD compared to controls, and lower PlGF and higher sFlt-1 levels were found in maternal serum at 18–37 weeks of gestation, thereby indicating that these cases may have altered placental angiogenesis²⁰.

Angiogenesis is one of the regulatory pathways that control normal and abnormal heart development. VEGF-A expression is dynamic during embryonic heart development and is involved in both long-range and short-range signaling that influence vessel patterning. In mutant mouse embryos, two- to three-fold overexpression of VEGF-A, from its endogenous locus, results in severe abnormalities in heart development, including attenuated compact layer of myocardium,

overproduction of trabeculae, defective ventricular septation and outflow tract remodeling, resulting in lethal phenotype²¹. An excess of deleterious variants in VEGF-A pathway genes in Down syndrome (DS) has been associated with atrioventricular septal defects²². In biopsies from adults with Tetralogy of Fallot (TF), DNA microarray analysis revealed altered expression patterns for 236 genes including enhanced expression (1.5-2.2-fold) of angiogenic factors and their receptors VEGF, Flt-1 and angiopoietin-2²³.

We hypothesize that, in CHD, a dysregulation occurs in the angiogenesis pathways involved in brain development that may cause a higher risk of neurological impairment. The present study aimed to study the expression of anti-angiogenic/angiogenic factors and chronic hypoxia genes from two distinct brain tissue areas (frontal lobe and basal ganglia) from euploid human fetuses with and without CHD.

Methods

All samples were obtained from pregnancy termination products in women carrying fetuses with congenital heart diseases (CHD). All patients provided their written consent for the storage and use of tissue samples for research purposes. All samples were obtained from the Fetal Tissue Bank of Vall d'Hebron University Hospital. At autopsy, nine different regions of brain were dissected and stored according a standardized sampling protocol. For our study, we selected two cerebral regions: (1) frontal cortex or (2) basal ganglia and hypothalamus. Study samples were compared with samples of fetuses without CHD (CTRL group). All control samples stemmed from therapeutic pregnancy terminations at 17 to 22 weeks of gestation in otherwise healthy women.

Ethics Committee approval

Brain tissue samples were provided by the Fetal Tissue Bank of the Vall d'Hebron University Hospital with appropriate Ethics Committee approval.

Extraction and real-time PCR (RT-PCR) quantification of mRNA.

Brain fetal tissue, from frontal cortex or basal ganglia and hypothalamus, were used for total RNA extraction. Frozen brain tissue samples were excised (less than 100 mg) using mortar and pestle, immersed in QIAzol Lysis Reagent (Qiagen) and thoroughly homogenized (20-40s) with a homogenizer (ULTRA-TURRAX T 10 basic Disperser/Homogenizer, IKA Works). Total RNA was extracted and treated with DNase using the RNeasy® Lipid Tissue (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. RNA yield and integrity were quantified on a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Scientific). RNA (500 ng/reaction) was used for cDNA synthesis with random hexamer primers (RevertAid H minus first strand cDNA synthesis kit, Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). Inventoried (Table 1) and customized (sFlt-1) TaqMan Gene Expression Assays were obtained from Applied Biosystems. Sequences for sFlt-1 primers and probe were as follows:

forward, 5'-GGGAAGAAATCCTCCAGAAGAAAGA-3';

reverse, 5'-GAGATCCGAGAGAAAACAGCCTTT-3';

and probe, 5'-AGTGCTCACCTCTGATTG-3'²⁴

mRNA expression levels were normalized to the levels of human DNA-directed RNA-polymerase II subunit A (POL2A; assay ID Hs00172187_m1), and a control sample was used as a calibrator. Relative expression was calculated by the double-delta Ct method, using Prism 7000 Sequence Detection System Software (v1.2.3) from Applied Biosystems.

Statistical analysis

Statistical analyses were made using GraphPad Prism software (GraphPad, version 5.0b, San Diego, CA, USA). Results are presented as mean with SEM. The D'Agostino and Pearson omnibus K2 tested the distribution of the variables for normality. When the assumption of normality was satisfied, data were analyzed by one-sided Student's unpaired t-test; otherwise, the non-parametric Mann-Whitney U test was used. The p-value threshold used for significant differences was less than 0.05.

Results

Brain tissue was analyzed in 15 fetuses with congenital heart diseases (CHD) and 12 fetuses without CHD (CTRL). No differences were observed in maternal characteristics, gestational age or the mode of delivery among groups (21.07 ± 0.35 vs. 20.79 ± 0.49 weeks, CHD vs. CTRL, respectively).

The presence of CHD was detected by prenatal ultrasound and confirmed by autopsy. Types of heart defects are listed in Table 2.

Gene expression profile in frontal cortex tissue of fetuses with congenital heart diseases compared with controls.

Gene expression in frontal cortex from CHD and CTRL fetuses is presented in Figure 1. No significant changes in HIF-1 α , HIF-2 α , VEGF-A and PlGF mRNA expression were observed between groups. However, sFlt-1 expression was upregulated in CHD compared controls (48%, $p=0.0431$).

Gene expression profile in basal ganglia and hypothalamus tissue of fetuses with congenital heart diseases compared with controls.

Genes differentially expressed in basal ganglia and hypothalamus are shown in Figure 2. Expressions of HIF-2 α , VEGF-A and sFlt-1 were significantly higher in CHD than in control group (98%, $p=0.0456$; 60%, $p=0.0432$ and 72%, $p=0.0369$). Pro-angiogenic factor PlGF remained unchanged. In contrast, no significant changes in HIF-1 α mRNA expression were observed between CHD and control groups.

Discussion

This study presents the first evidence of abnormal angiogenesis in brain tissue of human fetuses with CHD; with up-regulation of VEGF-A and sFlt-1 expression. Interestingly, sFlt-1 expression was increased 1.5 to 1.7-fold in CHD fetal samples, from both frontal cortex and basal ganglia and hypothalamus, compared to controls.

Moreover, an overproduction of HIF-2 α was observed in samples from basal ganglia and hypothalamus, probably as a consequence of chronic hypoxia.

Up to now several studies have displayed the relationship between congenital heart defects and neurodevelopment delay. Although initially it was thought that poorer neurodevelopmental outcome of these newborns was caused by the postnatal cardiac surgery^{6, 7, 25, 26}, nowadays it is believed that other pathophysiological mechanisms may be involved. Modern neuroimaging techniques showed high prevalence of prenatal structural brain abnormalities, reduced brain volume, brain maturation delay and altered brain circulation in fetuses with cardiac defects in the third trimester of pregnancy²⁷⁻²⁹. Furthermore, ultrasound studies have shown that fetuses with CHD had smaller head biometrics from the second trimester of pregnancy^{12, 13}. In our study, brain tissue from frontal cortex and basal ganglia and hypothalamus were selected because these regions manage, respectively, cognitive and motor abilities, which are affected in subjects with CHD^{30, 31}.

Abnormal placentation has recently been found related to congenital heart disease^{19, 20, 32}. Pregnant women with CHD have significantly more obstetric and offspring complications than healthy women. Moreover, significantly higher incidences of preeclampsia, IUGR and stillbirth in mothers carrying a fetus with CHD were reported, compared with the normal population³². In this regard, a large study published recently has confirmed that CHD is associated with placental anomalies, because placental weights, a proxy measure of placental function, were markedly smaller in three subtypes of newborns with CHD³³. The dysregulation of angiogenesis in the placenta and in the maternal-fetal circulation has emerged as one of the pathophysiological features in the development of placental insufficiency and its clinical consequences, preeclampsia and intrauterine growth restriction^{34, 35}. Abnormal angiogenesis has also been related to other obstetric and fetal conditions such as peripartum cardiomyopathy and fetal cardiac defects, opening up new challenges for our understanding of angiogenic involvement in maternal cardiovascular function and fetal cardiac development^{20, 36}.

In fetuses with heart defects, neurological impairment is thought to be a consequence of diminished oxygen distribution and blood flow to the brain caused by abnormal heart morphology. A direct link between reduced cerebral oxygenation and impaired brain growth in fetuses with CHD has recently been reported using phase contrast cardiac magnetic resonance³⁷. CHD fetuses presented significant changes in

head biometry, brain perfusion, cortical development and brain metabolism, with signs of more severe alterations in cases with an expected severe reduction in brain oxygenated blood supply³⁸ in the third trimester of pregnancy. Smaller head biometrics was observed all types of CHD in the second trimester of pregnancy^{13, 39}, and these changes persisted towards the end of pregnancy and did not worsen with advancing gestational age, thereby suggesting that the cause of abnormal brain development could be already present from the beginning of pregnancy. In fact, Abu-Rustum and colleagues have recently described that head volume alterations could be detected as early as 11 to 14 weeks of gestation in fetuses with congenital heart defects⁴⁰.

Different pathogenic pathways leading to prenatal abnormal brain development in CHD, other than abnormal heart anatomy, may also exist. Alternatively, there might be an intrinsically abnormal vessel formation. Donofrio et al. stated that the difference between brain lesions in neonates with CHD and in those who sustained hypoxic ischaemic injury suggested that acquired brain injury in CHD may be related to an abnormality in brain development⁴¹. Licht et al., using a delay maturation score based on four parameters including myelination, cortical infolding, involution of glial cell migration bands and the presence of germinal matrix tissues, found a delay in brain development *in utero* of approximately 1 month⁴². Beca et al. recently reported that severity of brain immaturity at birth predicts the level of neurodevelopmental impairment at 2 years of age after cardiac surgery⁴³. A further possible explanation is that these cases have suffered vascular injuries due to intrinsically abnormal vessel formation that may delay maturation and growth. It has been hypothesized that altered brain development due to CHD may increase vulnerability to perioperative haemodynamic instability and intraoperative brain injury due to hypoxia and ischaemia⁴⁴. From the results of this and other studies, we may speculate that abnormal vessel formation is a common feature in all CDH fetal systems including the heart, brain and placenta.

To date, CHD animal models have not been adequate enough to understand the neurological deficits seen in these types of patients. On the one hand, nearly all-genetic mouse models of CHD result in embryonic lethality⁴⁵⁻⁴⁷. On the other hand, some large animal models have been used to understand the brain pathology of CHD, but these studies have been limited to surgical approaches⁴⁸⁻⁵⁰. Therefore, in order to better understand the neurological deficits seen in CHD patients, it is necessary to develop a model in which only cardiac defects were apparent *in utero* and allow proper birth and postnatal development⁵¹. However, using an experimental model of

conditional homozygous inactivation of VEGF in the early embryonic mouse brain was possible to describe that VEGF, via local secretion by neural progenitors and/or neurons⁵², induces brain angiogenesis and provides instructive cues for the correct spatial organization of the vasculature⁵³. Moreover, in a murine cerebral infarction model was found an upregulation of mRNA and protein levels of VEGF and PlGF in different cell types⁵⁴. The neuroprotective effects of PlGF were also described using an *in vitro* rat model of cerebral ischemic injury⁵⁵. Recently, Luna and colleagues showed that PlGF deficiency was associated with impaired cerebral vascular development in a PlGF^{-/-} mice model⁵⁶. In our study, although no differences were found in PlGF expression, the slight expression of PlGF and overproduction of sFlt-1 in CHD cases compared to controls point out that a certain anti-angiogenic environment exists in both areas of the brain, that could lead to abnormal vessel formation and ramification in the brain of CHD fetuses.

We showed that mRNA expressions of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) were significantly increased in basal ganglia and hypothalamus in the CHD group compared to controls (60%, $p=0.0432$). Previous results demonstrated the importance of tightly regulating VEGF-A expression during cardiac development²¹. Expression of the gene for VEGF-A is tightly controlled and is stimulated under hypoxic conditions through both transcriptional and post-transcriptional mechanisms^{57, 58}. This study also evaluated the presence of hypoxia in CHD fetal brain by analyzing the expression of HIF-1 α and HIF-2 α . The expression of HIF-2 α , a marker of chronic hypoxia, was upregulated in basal ganglia and hypothalamus. This data agree with an autopsy study carried out by Glauser et al.⁵⁹, where they found that 45% of babies with hypoplastic left heart syndrome (HLHS) had hypoxic ischemic lesions and/or intracranial hemorrhage. Moreover, previous *in vitro* studies demonstrated that HIF-2 α preferentially activates VEGF expression⁶⁰. In our study, the increased expression of hypoxia-inducible genes is consistent with haemodynamic Doppler studies that point out that a certain degree of cerebral hypoxia might be also present in CHD³⁸.

There are several explanations for these findings: First of all, CHD fetuses may have an intrinsic altered placentation that may cause a certain degree of fetal hypoxia that could be related to abnormal heart and brain development. Alternatively, expression of angiogenic factors in brain tissue showed that, although hypoxia may have induced angiogenesis, no over-expression of PlGF was observed. However sFlt-1 expression was increased in basal and frontal cortex, irrespectively of hypoxia gene expression. These finding and the fact that similar results were observed in heart and

in blood from these cases, point out that abnormal angiogenesis could be one of the intrinsically pathogenic pathways leading to abnormal brain development.

We acknowledge that brain histology information might have offered important insights in relation with the interpretation of this potential association, and that future studies including this information are warranted. Finally, gene expression changes were not causal but instead secondary to CHD "milieu", however, as the evaluation of these factors was made in the second trimester of pregnancy, and not during embryogenesis, we are unable to ascertain whether angiogenic imbalance leads to abnormal brain development or rather is a consequence of the heart defect.

To the best of our knowledge, this is the first study to evaluate the relationship between angiogenesis and neurological impairment in CHD. Our results suggest that CHD determines an intrinsically-angiogenic impairment and chronic hypoxia that may be present in the fetal brain. Our findings are in agreement with those of observational studies that consistently showed abnormal prenatal neurological risk factors in CHD. Further studies would be of interest to elucidate to what extent angiogenesis is involved in CHD brain development.

Acknowledgements

The authors are grateful to Christine O'Hara for her help with the English version of the paper.

Sources of Funding

This study was supported by the Spanish Research Project in Health funded by ISCIII - the state plan for scientific and technical research and innovation 2013-2016 and European Regional Development Fund (ERDF), ref. PI13/01449. This study was also supported (in part) by RETICS "Maternal and Child Health and Development Network" (SAMID Network), funded by the PN I+D+i 2008-2011(Spain), ISCIII-Sub-Directorate General for Research Assessment and Promotion and the European Regional Development Fund (ERDF), ref. RD12/0026.

Disclosures

No

References

1. Donofrio MT, Moon-Grady AJ, Hornberger LK, Copel JA, Sklansky MS, Abuhamad A, Cuneo BF, Huhta JC, Jonas RA, Krishnan A, Lacey S, Lee W, Michelfelder EC Sr, Rempel GR, Silverman NH, Spray TL, Strasburger JF, Tworetzky W, Rychik J; American Heart Association Adults With Congenital Heart Disease Joint Committee of the Council on Cardiovascular Disease in the Young and Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and Council on Cardiovascular and Stroke Nursing. Diagnosis and treatment of fetal cardiac disease: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation*. 2014; 129: 2183-2242.
2. Bakiler AR, Ozer EA, Kanik A, Kanit H, Aktas FN. Accuracy of prenatal diagnosis of congenital heart disease with fetal echocardiography. *Fetal Diagn Ther*. 2007; 22: 241-244.
3. Bellinger DC, Wypij D, Rivkin MJ, DeMaso DR, Robertson RL Jr, Dunbar-Masterson C, Rappaport LA, Wernovsky G, Jonas RA, Newburger JW. Adolescents with d-transposition of the great arteries corrected with the arterial switch procedure: neuropsychological assessment and structural brain imaging. *Circulation*. 2011; 124: 1361-1369.
4. Newburger JW, Sleeper LA, Bellinger DC, Goldberg CS, Tabbutt S, Lu M, Mussatto KA, Williams IA, Gustafson KE, Mital S, Pike N, Sood E, Mahle WT, Cooper DS, Dunbar-Masterson C, Krawczeski CD, Lewis A, Menon SC, Pemberton VL, Ravishankar C, Atz TW, Ohye RG, Gaynor JW; Pediatric Heart Network Investigators. Early developmental outcome in children with hypoplastic left heart syndrome and related anomalies: the single ventricle reconstruction trial. *Circulation*. 2012; 125: 2081-1991.
5. Goldberg CS, Lu M, Sleeper LA, Mahle WT, Gaynor JW, Williams IA, Mussatto KA, Ohye RG, Graham EM, Frank DU, Jacobs JP, Krawczeski C, Lambert L, Lewis A, Pemberton VL, Sananes R, Sood E, Wechsler SB, Bellinger DC, Newburger JW; Pediatric Heart Network Investigators. Factors associated with neurodevelopment for children with single ventricle lesions. *J Pediatr*. 2014; 165:490-496.
6. O'Hare B, Bissonnette B, Bohn D, Cox P, Williams W. Persistent low cerebral blood flow velocity following profound hypothermic circulatory arrest in infants. *Can J Anaesth*. 1995; 42:964-971.

7. Ferry PC. Neurologic sequelae of open-heart surgery in children. An 'irritating question'. *Am J Dis Child*. 1990; 144:369-373.
8. Miller SP, McQuillen PS, Hamrick S, Xu D, Glidden DV, Charlton N, Karl T, Azakie A, Ferriero DM, Barkovich AJ, Vigneron DB. Abnormal brain development in newborns with congenital heart disease. *N Engl J Med*. 2007; 357: 1928-1938.
9. Mahle WT, Tavani F, Zimmerman RA, Nicolson SC, Galli KK, Gaynor JW, Clancy RR, Montenegro LM, Spray TL, Chiavacci RM, Wernovsky G, Kurth CD. An MRI study of neurological injury before and after congenital heart surgery. *Circulation*. 2002; 106:1109-114.
10. Hinton RB, Andelfinger G, Sekar P, Hinton AC, Gendron RL, Michelfelder EC, Robitaille Y, Benson DW. Prenatal head growth and white matter injury in hypoplastic left heart syndrome. *Pediatr Res*. 2008; 64: 364-369.
11. Shillingford AJ, Ittenbach RF, Marino BS, Rychik J, Clancy RR, Spray TL, Gaynor JW, Wernovsky G. Aortic morphometry and microcephaly in hypoplastic left heart syndrome. *Cardiol Young*. 2007; 17:189-195.
12. Masoller N, Martínez JM, Gómez O, Bennasar M, Crispi F, Sanz-Cortés M, Egaña-Ugrinovic G, Bartrons J, Puerto B, Gratacós E. Evidence of second-trimester changes in head biometry and brain perfusion in fetuses with congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014; 44:182-187.
13. Ruiz A, Cruz-Lemini M, Masoller N, Sanz-Cortés M, Ferrer Q, Ribera I, Martínez JM, Crispi F, Arévalo S, Gómez O, Pérez-Hoyos S, Carreras E, Gratacós E, Llurba E. Longitudinal changes in fetal biometries and cerebroplacental haemodynamics in fetuses with congenital heart disease. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016. doi: 10.1002/uog.15970.
14. McQuillen PS, Goff DA, Licht DJ. Effects of congenital heart disease on brain development. *Prog Pediatr Cardiol*. 2010; 29:79-85.
15. Donofrio MT, Duplessis AJ, Limperopoulos C. Impact of congenital heart disease on fetal brain development and injury. *Curr Opin Pediatr*. 2011; 23:502-511.
16. Berg C, Gembruch O, Gembruch U, Geipel A. Doppler indices of the middle cerebral artery in fetuses with cardiac defects theoretically associated with impaired cerebral oxygen

delivery in utero: is there a brain-sparing effect? *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2009; 34:666-672.

17. Arduini M, Rosati P, Caforio L, Guariglia L, Clerici G, Di Renzo GC, Scambia G. Cerebral blood flow autoregulation and congenital heart disease: possible causes of abnormal prenatal neurologic development. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011; 24:1208-1211.

18. Donofrio MT, Bremer YA, Schieken RM, Gennings C, Morton LD, Eidem BW, Cetta F, Falkensammer CB, Huhta JC, Kleinman CS. Autoregulation of cerebral blood flow in fetuses with congenital heart disease: the brain sparing effect. *Pediatr Cardiol.* 2003; 24:436-443.

19. Llurba E, Syngelaki A, Sánchez O, Carreras E, Cabero L, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor at 11-13 weeks' gestation and fetal cardiac defects. *Ultrasound Obstet Gynecol.* 2013; 42:169-174.

20. Llurba E, Sánchez O, Ferrer Q, Nicolaides KH, Ruíz A, Domínguez C, Sánchez-de-Toledo J, García-García B, Soro G, Arévalo S, Goya M, Suy A, Pérez-Hoyos S, Alijotas-Reig J, Carreras E, Cabero L. Maternal and foetal angiogenic imbalance in congenital heart defects. *Eur Heart J.* 2014; 35:701-707.

21. Miquerol L, Langille BL, Nagy A. Embryonic development is disrupted by modest increases in vascular endothelial growth factor gene expression. *Development.* 2000; 127:3941-3946.

22. Ackerman C, Locke AE, Feingold E, Reshey B, Espana K, Thusberg J, Mooney S, Bean LJ, Dooley KJ, Cua CL, Reeves RH, Sherman SL, Maslen CL. An excess of deleterious variants in VEGF-A pathway genes in Down-syndrome-associated atrioventricular septal defects. *Am J Hum Genet.* 2012; 91:646-659.

23. Peters TH, Sharma V, Yilmaz E, Mooi WJ, Bogers AJ, Sharma HS. DNA microarray and quantitative analysis reveal enhanced myocardial VEGF expression with stunted angiogenesis in human tetralogy of Fallot. *Cell Biochem Biophys.* 2013; 67:305-316.

24. Nevo O, Many A, Xu J, Kingdom J, Piccoli E, Zamudio S, Post M, Bocking A, Todros T, Caniggia I. Placental expression of soluble fms-like tyrosine kinase 1 is increased in singletons and twin pregnancies with intrauterine growth restriction. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93:285-292.

25. Burrows FA, Hillier SC, McLeod ME, Iron KS, Taylor MJ. Anterior fontanel pressure and visual evoked potentials in neonates and infants undergoing profound hypothermic circulatory arrest. *Anesthesiology*. 1990; 73:632-636.
26. Newburger JW, Jonas RA, Wernovsky G, Wypij D, Hickey PR, Kuban KC, Farrell DM, Holmes GL, Helmers SL, Constantinou J, Carrazana E, Barlow JK, Walsh AZ, Lucius KC, Share JC, Wessel DL, Hanley FL, Mayer JE, Costaneda AR, Ware JH, et al. A comparison of the perioperative neurologic effects of hypothermic circulatory arrest versus low-flow cardiopulmonary bypass in infant heart surgery. *N Engl J Med*. 1993; 329:1057-1064.
27. Khalil A, Bennet S, Thilaganathan B, Paladini D, Griffiths P, Carvalho JS. Prevalence of prenatal brain abnormalities in fetuses with congenital heart disease: a systematic review. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016; 48:296-307.
28. Khalil A, Suff N, Thilaganathan B, Hurrell A, Cooper D, Carvalho JS. Brain abnormalities and neurodevelopmental delay in congenital heart disease: systematic review and meta-analysis. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2014; 43:14-24.
29. Li Y, Yin S, Fang J, Hua Y, Wang C, Mu D, Zhou K. Neurodevelopmental delay with critical congenital heart disease is mainly from prenatal injury not infant cardiac surgery: current evidence based on a meta-analysis of functional magnetic resonance imaging. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2015; 45:639-648.
30. Snookes SH, Gunn JK, Eldridge BJ, Donath SM, Hunt RW, Galea MP, Shekerdemian L. A systematic review of motor and cognitive outcomes after early surgery for congenital heart disease. *Pediatrics*. 2010; 125:e818-827.
31. Schaefer C, von Rhein M, Knirsch W, Huber R, Natalucci G, Caflisch J, Landolt MA, Latal B. Neurodevelopmental outcome, psychological adjustment, and quality of life in adolescents with congenital heart disease. *Dev Med Child Neurol*. 2013; 55:1143-1149.
32. Ruiz A, Ferrer Q, Sánchez O, Ribera I, Arévalo S, Alomar O, Mendoza M, Cabero L, Carrerras E, Llurba E. Placenta-related complications in women carrying a foetus with congenital heart disease. *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2016; 29:3271-3275.

33. Matthiesen NB, Henriksen T, Agergaard P, Gaynor WJ, Bach CC, Hjortdal V, Ostergaard J. Congenital Heart Defects and Indices of Placental and Fetal Growth in a Nationwide Study of 924,422 Liveborn Infants. *Circulation*. 2016; 134: 1546-1556. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021793.
34. Llurba E, Crispi F, Verlohren S. Update on the pathophysiological implications and clinical role of angiogenic factors in pregnancy. *Fetal Diagn Ther*. 2015; 37:81-92.
35. Akolekar R1, Zaragoza E, Poon LC, Pepes S, Nicolaides KH. Maternal serum placental growth factor at 11+0 to 13+6 weeks of gestation in the prediction of pre-eclampsia. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2008; 32:732-739.
36. Patten IS, Rana S, Shahul S, Rowe GC, Jang C, Liu L, Hacker MR, Rhee JS, Mitchell J, Mahmood F, Hess P, Farrell C, Koulisis N, Khankin EV, Burke SD, Tudorache I, Bauersachs J, del Monte F, Hilfiker Kleiner D, Karumanchi SA, Arany Z. Cardiac angiogenic imbalance leads to peripartum cardiomyopathy. *Nature*. 2012; 485:333-8
37. Sun L, Macgowan CK, Sled JG, Yoo SJ, Manlhiot C, Porayette P, Grosse-Wortmann L, Jaeggi E, McCrindle BW, Kingdom J, Hickey E, Miller S, Seed M. Reduced fetal cerebral oxygen consumption is associated with smaller brain size in fetuses with congenital heart disease. *Circulation*. 2015; 131:1313-1323.
38. Masoller N, Sanz-Cortés M, Crispi F, Gómez O, Bennasar M, Egaña-Ugrinovic G, Bargalló N, Martínez JM, Gratacós E. Severity of Fetal Brain Abnormalities in Congenital Heart Disease in Relation to the Main Expected Pattern of in utero Brain Blood Supply. *Fetal Diagn Ther*. 2016; 39:269-278
39. Masoller N, Sanz-Cortés M, Crispi F, Gómez O, Bennasar M, Egaña-Ugrinovic G, Bargalló N, Martínez JM, Gratacós E. Mid-gestation brain Doppler and head biometry in fetuses with congenital heart disease predict abnormal brain development at birth. *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016; 47:65-73.
40. Abu-Rustum RS, Ziade MF, Abu-Rustum SE, Daou LS. Are There Head Volume Alterations at 11 to 14 Weeks in Fetuses with Congenital Heart Defects? A First Trimester Case Series. *AJP Rep*. 2016; 6:e232-238.

41. Donofrio MT, Massaro AN. Impact of congenital heart disease on brain development and neurodevelopmental outcome. *Int J Pediatr.* 2010; 2010. pii: 359390. doi: 10.1155/2010/359390.
42. Licht DJ, Wang J, Silvestre DW, Nicolson SC, Montenegro LM, Wernovsky G, Tabbutt S, Durning SM, Shera DM, Gaynor JW, Spray TL, Clancy RR, Zimmerman RA, Detre JA. Preoperative cerebral blood flow is diminished in neonates with severe congenital heart defects. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2004; 128:841-849.
43. Beca J, Gunn JK, Coleman L, Hope A, Reed PW, Hunt RW, Finucane K, Brizard C, Dance B, Shekerdemian LS. New white matter brain injury after infant heart surgery is associated with diagnostic group and the use of circulatory arrest. *Circulation.* 2013; 127:971-979.
44. Gaynor JW, Stopp C, Wypij D, Andropoulos DB, Atallah J, Atz AM, Beca J, Donofrio MT, Duncan K, Ghanayem NS, Goldberg CS, Hövels-Gürich H, Ichida F, Jacobs JP, Justo R, Latal B, Li JS, Mahle WT, McQuillen PS, Menon SC, Pemberton VL, Pike NA, Pizarro C, Shekerdemian LS, Synnes A, Williams I, Bellinger DC, Newburger JW; International Cardiac Collaborative on Neurodevelopment (ICCON) Investigators. Neurodevelopmental outcomes after cardiac surgery in infancy. *Pediatrics.* 2015; 135:816-825.
45. Misra C, Sachan N, McNally CR, Koenig SN, Nichols HA, Guggilam A, Lucchesi PA, Pu WT, Srivastava D, Garg V. Congenital heart disease-causing Gata4 mutation displays functional deficits in vivo. *PLoS Genet.* 2012; 8:e1002690
46. Makki N, Capecchi MR. Cardiovascular defects in a mouse model of HOXA1 syndrome. *Hum Mol Genet.* 2012; 21:26-31.
47. Tang S, Snider P, Firulli AB, Conway SJ. Trigenic neural crest-restricted Smad7 over-expression results in congenital craniofacial and cardiovascular defects. *Dev Biol.* 2010; 344:233-247.
48. Allen JG, Weiss ES, Wilson MA, Arnaoutakis GJ, Blue ME, Talbot CC Jr, Jie C, Lange MS, Troncoso JC, Johnston MV, Baumgartner WA, Hawley H. Seiler Resident Award. Transcriptional profile of brain injury in hypothermic circulatory arrest and cardiopulmonary bypass. *Ann Thorac Surg.* 2010; 89:1965-1971.

49. Haldenwang PL, Strauch JT, Müllem K, Reiter H, Liakopoulos O, Fischer JH, Christ H, Wahlers T. Effect of pressure management during hypothermic selective cerebral perfusion on cerebral hemodynamics and metabolism in pigs. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2010; 139:1623-1631.
50. Pastuszko P, Schears GJ, Pirzadeh A, Kubin J, Greeley WJ, Wilson DF, Pastuszko A. Effect of granulocyte-colony stimulating factor on expression of selected proteins involved in regulation of apoptosis in the brain of newborn piglets after cardiopulmonary bypass and deep hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2012; 143:1436-1442.
51. Morton PD, Ishibashi N, Jonas RA, Gallo V. Congenital cardiac anomalies and white matter injury. *Trends Neurosci.* 2015; 38:353-363.
52. Ogunshola OO, Stewart WB, Mihalcik V, Solli T, Madri JA, Ment LR. Neuronal VEGF expression correlates with angiogenesis in postnatal developing rat brain. *Brain Res Dev Brain Res.* 2000; 119:139-153.
53. Raab S, Beck H, Gaumann A, Yüce A, Gerber HP, Plate K, Hammes HP, Ferrara N, Breier G. Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thromb Haemost.* 2004; 91: 595-605.
54. Beck H, Acker T, Püschel AW, Fujisawa H, Carmeliet P, Plate KH. Cell type-specific expression of neuropilins in an MCA-occlusion model in mice suggests a potential role in post-ischemic brain remodeling. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61:339-350.
55. Du H, Li P, Pan Y, Li W, Hou J, Chen H, Wang J, Tang H. Vascular endothelial growth factor signaling implicated in neuroprotective effects of placental growth factor in an in vitro ischemic model. *Brain Res.* 2010; 1357:1-8.
56. Luna RL, Kay VR, Rätsep MT, Khalaj K, Bidarimath M, Peterson N, Carmeliet P, Jin A, Croy BA. Placental growth factor deficiency is associated with impaired cerebral vascular development in mice. *Mol Hum Reprod.* 2016; 22:130-142.

57. Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W. Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem*. 1995; 270:19761-19766.

58. Levy AP, Levy NS, Goldberg MA. Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem*. 1996; 271: 2746-2753.

59. Glauser TA, Rorke LB, Weinberg PM, Clancy RR. Congenital brain anomalies associated with the hypoplastic left heart syndrome. *Pediatrics*. 1990; 85:984-990.

60. Gordan JD, Bertout JA, Hu CJ, Diehl JA, Simon MC. HIF-2alpha promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell*. 2007; 11:335-347.

Tables

Table 1. Inventoried TaqMan Gene Expression Assays from Applied Biosystems.

Gene symbol and description	TaqMan Gene Expression Assay ID
HIF1- α	Hs00153153_m1
HIF2- α	Hs01026149_m1
VEGF-A	Hs00900055_m1
PlGF	Hs00182176_m1

HIF-1 α , Hypoxia Inducible Factor 1-alpha; HIF-2 α , Hypoxia Inducible Factor 2-alpha; VEGF-A, vascular endothelial growth factor A; PlGF, placental growth factor.

Table 2. Types of congenital heart defects analyzed in the study group.

	Percentage
Interventricular communication	4 (27)
HLHS	5 (33)
Tricuspid valve atresia	2 (13)
Fallot	2 (13)
TGA	2 (13)

Values are expressed as number (%)

HLHS, Hypoplastic left heart syndrome; TGA, Transposition of the great arteries.

Figures

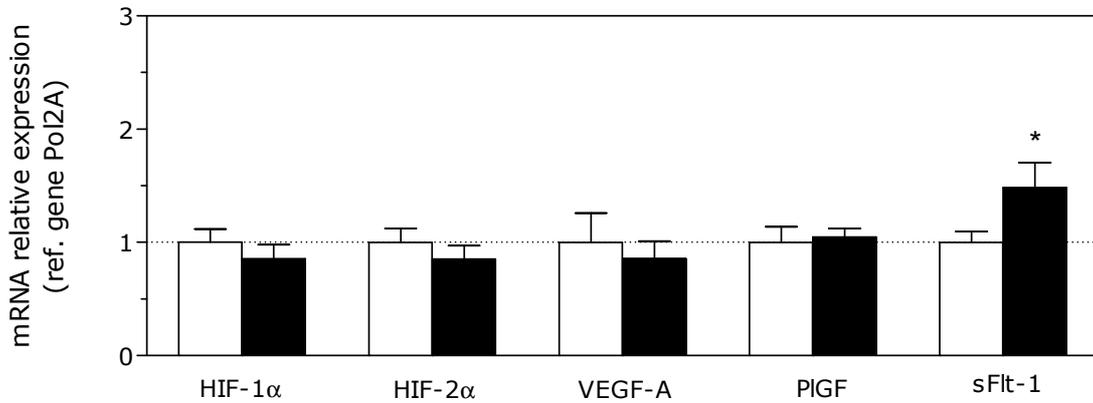


Figure 1. HIF-1 α , HIF-2 α , vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), placental growth factor (PLGF) and sFlt-1 expression genes in frontal cortex of fetal brain tissue in congenital heart defects (black columns) and controls (white columns). Differences were analyzed by Student's t-test or the nonparametric Mann–Whitney U test, as appropriate. Data are presented as mean \pm SE.

*p < 0.05.

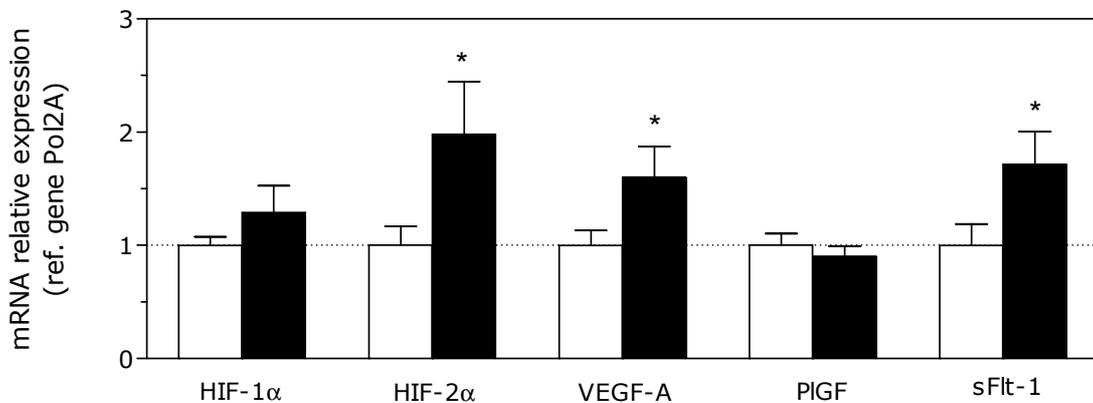


Figure 2. HIF-1 α , HIF-2 α , vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), placental growth factor (PLGF) and sFlt-1 expression genes in basal nuclei and the hypothalamus of fetal brain tissue in congenital heart defects (black columns) and controls (white columns). Differences were analyzed by Student's t-test or the nonparametric Mann–Whitney U test, as appropriate. Data are presented as mean \pm SE. *p < 0.05.

