

Universidad CEU San Pablo
CEINDO – CEU Escuela Internacional de
Doctorado

PROGRAMA en CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE LA SALUD



BASES MOLECULARES DE PATOLOGÍAS DEL
EMBARAZO: IDENTIFICACIÓN DE
POLIMORFISMOS Y MECANISMOS
MOLECULARES. RELACIÓN CON LAS
ALTERACIONES METABÓLICAS MATERNAS.

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

Eva de la Fuente Luelmo.

Dirigida por: M^a del Pilar Ramos Álvarez y María Haro García.

MADRID
2022

TESIS DOCTORAL
EVA DE LA FUENTE LUELMO
2022

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Química y Bioquímica de la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU-San Pablo, bajo la dirección de las Dras. M^a del Pilar Ramos Álvarez, Catedrática de Bioquímica y Biología Molecular, María Haro García, Profesora Adjunta de Bioquímica y Biología Molecular.

No hubiera sido posible realizar este trabajo sin la colaboración del Dr. José Luis Bartha, al que le estamos profundamente agradecidas por toda su ayuda y dedicación, así como al Dr. Ángel Campos por la colaboración en el estudio de genotipado.

Mis más profundos agradecimientos al personal de administración y servicios de la Universidad San Pablo CEU, así como a la escuela de doctorado CEINDO que ha dado soporte a toda mi formación.

No habría espacio suficiente en todas las páginas de este documento para agradecer todo el cariño y el apoyo que he recibido durante estos años. He sentido como cada uno de vosotros participabais conmigo en este proceso, siempre presentes, siempre pacientes y dispuestos a ayudarme.

Solo tú sabes lo agradecida que estoy, por tu ayuda, tu apoyo, tu cariño, tu paciencia tu comprensión y tus ánimos.

*Por eso **GRACIAS...***

A mis directoras

A mis compañeros

A mis amigos

A mi familia

Gracias a ti.

Soy muy afortunada por teneros, siempre me he sentido muy querida y arropada.

Gracias por estar ahí

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	3
1.1	La gestación.	4
1.1.1	Desarrollo embrionario.	4
1.1.2	La placenta.	5
1.1.3	Metabolismo materno durante la gestación.	12
1.1.4	Gestaciones gemelares	14
1.2	Patologías del embarazo.	16
1.2.1	Diabetes gestacional.	16
1.2.2	Preeclampsia.	20
2	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	25
3	MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1	Secuenciación de DNA para el análisis de genotipado.	28
3.1.1	Aislamiento de DNA.	28
3.1.2	Panel de genotipado.	28
3.2	Identificación y análisis de miRNA en plasma de mujeres con y sin diabetes gestacional.	30
3.2.1	Aislamiento de miRNA para la secuenciación.	30
3.2.2	Secuenciación de miRNAs.	31
3.2.3	Validación de los niveles de miRNA de plasma. Aislamiento de miRNA y análisis por RT-qPCR.	32
3.3	Análisis de cuantificación de mRNA en placenta de tercer trimestre	34
3.3.1	Aislamiento de RNA de placenta de tercer trimestre	34
3.3.2	Retrotranscripción del RNA aislado para la obtención de DNA copia (cDNA)	36
3.3.3	Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real.	36
3.3.4	Cuantificación relativa del nivel de mRNA.	37
3.3.5	Cuantificación de proteína mediante <i>western-blot</i> (WB)	39
3.4	Análisis estadístico.	41
3.4.1	Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de genotipado.	42
3.4.2	Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de secuenciación de miRNAs.	42
3.4.3	Análisis estadístico de los resultados de cuantificación de miRNA tras la validación, y de los mRNA y proteínas en placenta de tercer trimestre.	43
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	45
4.1	OBJETIVO 1: Resultados y discusión	46
4.1.1	Características clínicas de las gestantes.	47
4.1.2	Estudio de genotipado en gestantes con y sin diabetes gestacional.	48
4.1.3	miRNAs circulantes como biomarcadores de diabetes gestacional de desarrollo en primer o en segundo trimestre de la gestación.	59
4.2	OBJETIVO 2: Resultados y discusión	72
4.2.1	Estudio 1: Análisis de gestaciones no patológicas simples y gemelares.	74
4.2.2	Estudio 2: Cambios en la expresión génica en la placenta de gestaciones complicadas con preeclampsia.	98
4.3	Limitaciones del estudio:	125
5	CONCLUSIÓN	126
6	BIBLIOGRAFÍA	128

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Consecuencias de la diabetes gestacional.....</i>	<i>18</i>
<i>Tabla 2. Sintomatología y diagnóstico de la preeclampsia</i>	<i>21</i>
<i>Tabla 3. Consecuencias de la preeclampsia</i>	<i>22</i>
<i>Tabla 4. Panel de genes analizado</i>	<i>29</i>
<i>Tabla 5. Listado de primers utilizados para el análisis de microRNA.....</i>	<i>33</i>
<i>Tabla 6. Listado de primers utilizados para el análisis de mRNA en placenta.....</i>	<i>38</i>
<i>Tabla 7. Listado de anticuerpos.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 8. Características clínicas materna, fetales y obstétricas de gestaciones control y con diabetes gestacional..</i>	<i>48</i>
<i>Tabla 9. Estudio de genotipado. Comparación control versus diabetes gestacional (DG).....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 10. Estudio de genotipado. Comparación de gestación control versus diabetes gestacional diagnosticada en primer trimestre (DG1).....</i>	<i>56</i>
<i>Tabla 11. Estudio de genotipado. Comparación control versus diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre (DG2).....</i>	<i>58</i>
<i>Tabla 12. Niveles circulantes de miRNAs en plasma de mujeres control y mujeres con diabetes gestacional.</i>	<i>61</i>
<i>Tabla 13. Niveles circulantes de miRNAs en plasma de mujeres control y mujeres con diabetes gestacional diagnosticada en primer trimestre.....</i>	<i>62</i>
<i>Tabla 14. Niveles circulantes de miRNAs en plasma de mujeres control y mujeres con diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre.....</i>	<i>63</i>
<i>Tabla 15. Niveles circulantes de miRNAs en plasma de mujeres diabetes gestacional diagnosticada en primer trimestre y mujeres con diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre.....</i>	<i>64</i>
<i>Tabla 16. Procesos biológicos en los que participa miR-206.....</i>	<i>66</i>
<i>Tabla 17. Procesos biológicos en los que participa miR-224p-5p.....</i>	<i>71</i>
<i>Tabla 18. Datos clínicos maternos y obstétricos de la cohorte de estudio</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 19. Datos clínicos fetales de la cohorte de estudio</i>	<i>74</i>
<i>Tabla 20. Datos clínicos maternos, fetales y obstétricos de la cohorte de estudio.....</i>	<i>99</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Sección de la placenta humana a término.....</i>	<i>6</i>
<i>Figura 2. Transportadores de nutrientes en la placenta a término.....</i>	<i>8</i>
<i>Figura 3. Esquema de las adaptaciones metabólicas maternas a lo largo de la gestación.....</i>	<i>14</i>
<i>Figura 4. Esquema general de las etapas de la gestación.....</i>	<i>15</i>
<i>Figura 5. Prevalencia de diabetes gestacional en el año 2021.....</i>	<i>16</i>
<i>Figura 6. Esquema general de las etapas de la gestación.....</i>	<i>23</i>
<i>Figura 7. Esquema de flujo de trabajo empleado para el análisis de miRNAs circulantes en plasma de gestantes con y sin diabetes gestacional.....</i>	<i>30</i>
<i>Figura 8. Esquema del diseño experimental del estudio de biomarcadores diagnósticos en diabetes gestacional.....</i>	<i>47</i>
<i>Figura 9. Análisis de los datos clínicos de las gestantes control y gestantes con diabetes gestacional.....</i>	<i>48</i>
<i>Figura 10. Representación gráfica de frecuencia alélica.....</i>	<i>51</i>
<i>Figura 11. Representación gráfica de frecuencia alélica de los polimorfismos de MTNR1B.....</i>	<i>57</i>
<i>Figura 12. Representación gráfica de frecuencia alélica del polimorfismo de KCNJ11.....</i>	<i>58</i>
<i>Figura 13. Heat-map y la agrupación jerárquica no supervisada por muestra y miRNA en el grupo de gestantes control (azul oscuro) y de mujeres con diabetes gestacional (DG1, rojo; DG2 azul claro).....</i>	<i>60</i>
<i>Figura 14. Volcano plot de gestantes control versus las gestantes con DG.....</i>	<i>61</i>
<i>Figura 15. Volcano plot de gestantes control versus las gestantes con DG1.....</i>	<i>62</i>
<i>Figura 16. Volcano plot de gestantes control versus las gestantes con DG2.....</i>	<i>63</i>
<i>Figura 17. Volcano plot de gestantes con DG2 versus DG1.....</i>	<i>64</i>
<i>Figura 18. Niveles circulantes de hsa-miR-206 en plasma de gestantes control y gestantes con diabetes gestacional.....</i>	<i>66</i>
<i>Figura 19. Niveles circulantes de hsa-miR-224-5p en plasma de gestantes control y gestantes con diabetes gestacional.....</i>	<i>70</i>
<i>Figura 20. Diseño del estudio de expresión génica en placenta de gestantes de tercer trimestre.....</i>	<i>72</i>
<i>Figura 21. Análisis de los datos clínicos maternos fetales y obstétricos en gestaciones simples y gemelares.....</i>	<i>75</i>
<i>Figura 22. Nivel de mRNA relativo y nivel de proteínas en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones simples y gemelares.....</i>	<i>76</i>
<i>Figura 23. Nivel de mRNA relativo en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones simples y gemelares.....</i>	<i>77</i>
<i>Figura 24. Nivel de mRNA relativo de proteínas que participan en el transporte de nutrientes, en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones simples y gemelares.....</i>	<i>78</i>
<i>Figura 25. Nivel de mRNA relativo de proteínas que participan en el metabolismo lipídico de la placenta, en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones simples y gemelares.....</i>	<i>79</i>
<i>Figura 26. Nivel de mRNA relativo de proteínas que participan en procesos de proliferación celular (PTN, A) y angiogénesis (sFLT1, B, PGF, C y ENG, D), en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones simples y gemelares.....</i>	<i>80</i>
<i>Figura 27. Análisis del metabolismo lipídico de la placenta.....</i>	<i>81</i>
<i>Figura 28. Heat-map en el que se representa la correlación entre los niveles de expresión génica de los distintos genes estudiados en placentas procedentes de gestaciones no patológicas y los parámetros clínicos maternos, fetales y obstétricos.....</i>	<i>83</i>

<i>Figura 29. Mapa de calor en el que se representa la correlación entre los niveles de expresión génica de los distintos genes estudiados y los parámetros metabólicos en placentas procedentes de gestaciones no patológicas.</i>	<i>85</i>
<i>Figura 30. Heat-map en el que se representa la correlación entre los niveles de mRNA GLUT1, LPIN2, CBS y PI3K en placentas procedentes de gestaciones no patológicas y los parámetros clínicos maternos, fetales, obstétricos y metabólicos de la placenta.</i>	<i>88</i>
<i>Figura 31. Gráficos de correlación del nivel de mRNA de GLUT1 en la placenta con los niveles circulantes en la madre de colesterol asociado a LDL (A), HDL (B), la glucemia (C), y el peso del recién nacido (D).....</i>	<i>89</i>
<i>Figura 32. Correlación entre el nivel de mRNA de LPIN2 en la placenta con los niveles circulantes maternos de colesterol total (A), y la glucosa (B), en partos sencillos y partos gemelares.</i>	<i>91</i>
<i>Figura 33. Correlación entre el nivel de mRNA de CBS en la placenta con los niveles circulantes maternos de glucosa total (A), y el percentil del recién nacido (B), los niveles circulantes maternos de sFlt-1 (C) y PlGF (D), en partos sencillos y partos gemelares.</i>	<i>93</i>
<i>Figura 34. Correlación entre el nivel de mRNA de PI3KR en la placenta con los niveles de insulina materna (A), y el IMC materno al inicio de la gestación (B) en partos sencillos y partos gemelares.</i>	<i>94</i>
<i>Figura 35. Correlación entre el acúmulo de TG en las distintas caras de la placenta con el nivel de mRNA de PI3KR en la placenta con los niveles de insulina materna (A), y el IMC materno al inicio de la gestación (B) en partos sencillos y partos gemelares.....</i>	<i>96</i>
<i>Figura 36. Datos clínicos y bioquímicos de la madre y el recién nacido.....</i>	<i>100</i>
<i>Figura 37. mRNA de transportadores en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y complicadas con preeclamsia que mostraron diferencias entre los grupos de estudio.</i>	<i>102</i>
<i>Figura 38. Heat-map en el que se representa la correlación entre los niveles de mRNA de los transportadores en la placenta y diversos parámetros clínicos.</i>	<i>103</i>
<i>Figura 39. mRNA de transportadores en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y gestaciones complicadas con preeclamsia que no mostraron diferencias entre los grupos de estudio.</i>	<i>108</i>
<i>Figura 40. mRNA de proteínas implicadas en la β oxidación de ácidos grasos en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y gestaciones complicadas con preeclamsia.</i>	<i>110</i>
<i>Figura 41. Heat-map en el que se representa la correlación entre los niveles de mRNA de enzimas del metabolismo lipídico en la placenta y diversos parámetros clínicos.....</i>	<i>111</i>
<i>Figura 42. mRNA de proteínas implicadas en síntesis y esterificación de lípidos en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y gestaciones complicadas con preeclamsia.</i>	<i>115</i>
<i>Figura 43. mRNA de proteínas del metabolismo, así como proteínas que participan en señalización en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y complicadas con preeclamsia que mostraron diferencias entre los grupos de estudio.</i>	<i>118</i>
<i>Figura 44. mRNA relativo de proteínas que participan en la angiogénesis y proliferación celular, en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y complicadas con preeclamsia y que mostraron diferencias entre los grupos de estudio.</i>	<i>119</i>
<i>Figura 45. Heat-map en el que se representa la correlación entre los niveles de mRNA de proteínas que participan en angiogénesis y proliferación celular en la placenta y diversos parámetros clínicos.....</i>	<i>120</i>
<i>Figura 46. Gráfico de correlación entre la expresión de sFLT1 en la placenta y el peso del recién nacido.</i>	<i>122</i>
 <i>Ilustración 1. Esquema de las principales proteínas analizadas en el estudio.....</i>	 <i>87</i>

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

A

ABCA1: *ATP-binding cassette*
ACACA: Acetil-CoA Carboxilasa α
ACOX1: Acil-CoA Oxidasa 1
ACSL: acil-CoA sintetasa de cadena larga
ACSM: acil-CoA sintetasa de cadena media
ACSS: acil-CoA sintetasa de cadena corta
ADA: *American Diabetes Association*
AG: ácido graso
AGPI: ácido graso poliinsaturado
AMPC: adenosin monofosfato ciclico
AMPK:
AQP: acuaporina
AT1-AA: autoanticuerpo agonista del receptor de angiotensina II tipo 1
ATP: adenosina trifosfato

B

BCA: ácido bicinónico
BeWo: línea celular derivada de trofoblasto humano
BSA: albúmina de suero bovino

C

CAC: ciclo del ácido cítrico
CBS: cistationina β sintasa
CD36:
CDK5: quinasa dependiente de ciclina 5
CDKAL1: proteína 1 asociada con la subunidad reguladora CDK5 1
CNV: *variable copy number*
CPT1A: carnitina palmitoil transferasa 1
CPT2: carnitina palmitoil transferasa 2
CTRL: control

D

DG: diabetes gestacional
DG1: diabetes gestacional en primer trimestre
DG2: diabetes gestacional en segundo trimestre
DM2: diabetes tipo 2
dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

E

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético
ENG: endoglina
ET-1: endotelina 1

F

FABP: *fatty acid binding proteins*
FATP: proteína transportadora de ácidos grasos 1
FC: *Fold Change*
FIV: *fecundación in vitro*
FTO: *Fat mass and obesity-associated gene*

G

G6p: Glucosa 6 fosfato

GAPDH: gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa
GCK: glucoquinasa
GK: glicerolquinasa
GLIS3: *GLIS family zinc finger 3*
GLUT: transportador de glucosa
GMPc: Guanosin monofosfato ciclico
GO: gene ontology
GPAT4: glicerol 3 fosfato aciltransferasa 4
GPSM1: *G protein signaling modulator 1*
GPx: glutatión peroxidasa

H

HAPO: *Hyperglycemia and Adverse Pregnancy*
HDL: Lipoproteínas de alta densidad
HOMA-IR: modelo homeostático de evaluación de la resistencia en insulina
HSL: lipasa sensible a hormonas
HTZ: heterocigoto
HELLP: H(hemolysis); EL(elevated liver enzymes); LP (Low platelet count)
HDF: *High Fat Diet*
HIF: factor inducible de hipoxia
HK-2: hexoquinasa 2
HNF1A: *factor nuclear 1 α del hepatocito*
HO-1: hemooxigenasa

I

IADPSG: *Asociación Internacional de Grupos de Estudio de la Diabetes y el Embarazo*
IC: intervalo de confianza
IDF1: factores de crecimiento similar a insulina tipo 1
IGF-1: factor de crecimiento similar a la insulina
IGF2BP2: *insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2*
IL: *interleuquina*
IMC: índice de masa corporal
IMCi: índice de masa corporal previo a la gestación
INSIG1: gen 1 inducido por insulina
IRS-1: sustrato del receptor de insulina 1

K

KCNJ11: *potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11*

L

LAT: *Large neutral amino acids transporter*
LCHAD: 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga
LDL: lipoproteína de Baja densidad

lncRNA: long non coding RNA oRNA largo no codificante
LPIN2: *lipina2*
LPL: lipoproteína lipasa
LXR: *receptores X del hígado*

M

MALAT1: *metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1*
MAPK: proteína quinasa activada por mitógenos

MCAD: acil CoA-deshidrogenasa de cadena media
MIQE: Minimum Information for Publication of
Quantitative Real-Time PCR Experiments
miRNA: microRNA
MTNR1B: receptor de melatonina 1B
mTOR: diana de rapamicina en células de mamífero
MyoD: factor de transcripción miogenico

N

NCBI: National Center for Biotechnology information
NEFA: ácidos grasos no esterificados
NLRP3: *NLP family pyrin domain containing 3*

O

OGTT: prueba de tolerancia oral a la glucosa

P

PAD: Presión arterial diastólica
PAS: Presión arteril sistólica
pb: pares de bases
PCK2: fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 2
PCR: reacción en cadena de la polimerasa
PE: *early-onset preeclampsia*
PF: *primer forward*
PGF: factor de crecimiento placentario (GEN)
PI3K: fosfatidil inositol 3 quinasa
PI3K-R: fosfatidilinositol 3 quinasa subunidad reguladora
PK: *piruvato quinasa*
PL: late-onset preeclampsia
PIGF factor de crecimiento placentario (PROTEÍNA)
PPARG: receptor activado por el proliferador de
peroxisomas tipo gamma
PR: *Primer Reverse*
PTBP1: *proteína 1 de unión al tracto de polipirimidina*
PTN: pleiotrofina
PVDF: membrana de fluoruro de polivinilideno

R

RAF: Frecuencia del alelo de riesgo
RIPA: Radioimmunoprecipitation assay buffer
ROS: radicales libres de oxígeno
RPL30: proteína ribosomal L30
RREB1: Ras Responsive Element Binding Protein 1
RXR α : receptor-X-retinoide- α
rpm: revoluciones por minuto
RT-qPCR:

S

SDS: dodecil sulfato sodico
sENG: endoglina soluble
sFLT1: tirosin quinasa I soluble similar a FMS SNAT: *sodium-
dependent neutral amino acid transporter*
SNHG14: gen 14 del hospedador de RNA nucleolar pequeño
SNP: *single nucleotide polymorphism*
SOD: superóxido dismutasa

T

TCF7L2: factor de transcripción 7
TG: triglicéridos
TMM: valor normalizado de etiquetas por millón de lecturas
TNF- α : factor de necrosis tumoral
TPM: etiquetas por millón de lecturas

U

UV: ultravioleta

V

VEGF o FLT1: *factor de crecimiento endotelial
vascular*

W

WB: *western-blot*

RESUMEN

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS: La gestación es un proceso en el que se coordinan y ordenan todos los sistemas maternos bajo una estricta regulación. Cualquier alteración en estos procesos puede condicionar la aparición de patologías del embarazo, como la diabetes gestacional o la preeclampsia, suponiendo un riesgo tanto para madre como para el feto a corto y largo plazo. Nuestra hipótesis apunta a que determinadas variaciones genéticas, tanto a nivel materno como a nivel placentario, podrían predisponer a la mujer a desarrollar patologías del embarazo y como consecuencia, generar cambios en las estructuras embrionarias que modifiquen las condiciones del entorno intrauterino y el correcto desarrollo embriológico y fetal. El objetivo general de nuestro estudio está encaminado a ampliar el conocimiento de los factores involucrados en el desarrollo de patologías del embarazo, así como identificar posibles biomarcadores de estas patologías que permitan el abordaje temprano de la enfermedad.

DISEÑO EXPERIMENTAL: Para alcanzar nuestro objetivo hemos realizado un estudio de genotipado y determinación de los niveles plasmáticos de microRNAs en una cohorte de gestantes con diabetes gestacional de inicio en primer o segundo trimestre de la gestación, con el fin de encontrar posibles biomarcadores y/o dianas terapéuticas que permitan el diagnóstico y el tratamiento tempranos de la patología. Por otro lado, hemos llevado a cabo un estudio de expresión génica en placenta de tercer trimestre de gestantes con preeclampsia y gestantes control, a fin de profundizar en el conocimiento de las adaptaciones fisiológicas o patológicas que tienen lugar en la placenta.

RESULTADOS: i) se han identificado 6 polimorfismos que presentan una mayor frecuencia del alelo de riesgo en la cohorte de gestantes con diabetes gestacional, que son rs9379084 (*RREB1*), rs10814916 (*GLIS3*), rs11787792 (*GPSM1*), rs4402960 (*IGF2BP2*), rs1387153 y rs10830963 (*MTNR1B*). Además, se ha visto como los polimorfismos rs1387153 y rs10830963 del receptor de melatonina 1B (*MTNR1B*) son más frecuentes en la cohorte de mujeres con diabetes gestacional de aparición temprana, mientras que el polimorfismo rs5219 de *KCNJ11* presenta menor frecuencia del alelo de riesgo en la cohorte de gestantes con diabetes de aparición tardía.

ii) Se han identificado dos microRNAs cuyos niveles en el plasma materno se encuentran aumentados en las mujeres con diabetes gestacional, que son mayores en la de aparición tardía, respecto al grupo control, el hsa-miR-206 y el hsa-miR-224-5p.

iii) El análisis de expresión génica en placentas de tercer trimestre de gestaciones múltiples no patológicas muestra un aumento de la expresión génica en la cara fetal de las placentas gemelares de *GLUT1*, *CBS*, *LPIN2*, *PI3K*.

iv) El estudio de expresión génica en placentas de tercer trimestre de gestantes con preeclampsia muestra una disminución en la expresión de enzimas clave del metabolismo lipídico como son *LCHAD*, *MCAD*, *ACSS1*, *ACSL4*, *GPAT4*, *LPIN2* y *ACACA*, así como cambios en la expresión de transportadores, viéndose aumentada la de *GLUT1*, *GLUT3*, *AQP1* y disminuida la de *SLC38A2* y *FATP2*. Además, la expresión de *ENG* y *sFLT1* se encuentra aumentada en la cara fetal de las placentas con preeclampsia temprana, mientras que la de *PTN* y *PGF* está disminuida en la preeclampsia tardía.

CONCLUSIONES: Se han identificado los polimorfismos, rs1387153 y rs10830963 (*MTNR1B*), como potenciales candidatos como biomarcadores de diabetes gestacional de aparición temprana, y el *hsa-miR-206* circulante como potencial biomarcador de diabetes gestacional. Existe un comportamiento diferencial entre las caras de la placenta que se encuentra perfectamente coordinado y que permite acomodar los recursos maternos a la demanda energética fetal, como ocurre en las gestaciones gemelares. El alterado balance de la angiogénesis que se presenta en la placenta en preeclampsia tiene un diferente origen dependiendo del momento en el que se desarrolla. Así, en preeclampsia de aparición temprana el defecto está asociado a un aumento de la expresión de factores antiangiogénicos, como *sFLT1*, mientras que, en la preeclampsia de aparición tardía, la angiogénesis defectuosa podría estar relacionada con la disminución de los factores angiogénicos, *PGF* y *PTN* en la placenta. Además, en las placentas con preeclampsia se observa un cambio en la expresión de transportadores y enzimas del metabolismo lipídico que es más evidente en la cara fetal de la placenta, y podría ser la consecuencia de un posible mecanismo adaptativo para permitir asegurar una suficiente disponibilidad de ATP tanto para la placenta como para el feto.

Palabras Clave

Gestación, preeclampsia, diabetes gestacional, placenta, miRNA, genotipado.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 LA GESTACIÓN.

La gestación es un estado fisiológico, en el cual, la mujer alberga en su interior un embrión en continuo desarrollo hasta el momento del parto. En humanos la duración de la gestación es de aproximadamente 40 semanas desde la fecha de la última menstruación, 9 meses o 38 semanas después de la fecundación ([Sadler, 2019](#)).

1.1.1 Desarrollo embrionario.

La gestación da comienzo con la fecundación, proceso por el que se produce la fusión de los gametos femenino y masculino originando así el cigoto. En este momento se establece el número diploide de cromosomas, quedando determinado el sexo del futuro bebé. Cuando el cigoto se encuentra en fase bicelular se inicia un proceso de segmentación por división mitótica hasta alcanzar la estructura denominada mórula, formada por 16 células aproximadamente. El cigoto se encuentra en estadio de mórula cuando alcanza el útero. En este momento las células sufren un proceso de compactación que les permite interactuar, estableciéndose así dos masas celulares diferenciadas que forman una estructura denominada blastocisto. El blastocisto presenta una masa de células internas denominada embrioblasto, situada en un polo del blastocisto, a partir de la que se desarrollarán los distintos tejidos embrionarios. Rodeando al embrioblasto se encuentra una capa celular delgada y externa, denominada trofoblasto, a partir de la cual se desarrolla la parte embrionaria de la placenta ([Moore, Persaud, & Torchia, 2020](#); [Sadler, 2019](#)).

Gracias a la acción conjunta del trofoblasto y del epitelio endometrial del útero, se produce la implantación del blastocisto. Esta unión se da con firmeza debido a la proliferación rápida del trofoblasto que invade la pared uterina. El trofoblasto produce una serie de enzimas que erosionan el tejido materno a fin de incluir al blastocisto en el endometrio, permitiéndole así nutrirse a partir del tejido materno. Por su parte, el estroma endometrial sufre un proceso denominado reacción decidual, en el cual se producen una serie de cambios celulares y vasculares en el endometrio. En respuesta a la reacción decidual las células de la decidua van a acumular mayor cantidad de glucógeno y lípidos, que servirá para sustentar los requerimientos del embrión en los primeros días de su desarrollo. Esta reacción decidual permite regular el proceso de implantación. No solo facilitando el aporte de nutrientes necesario, sino también controlando la invasión del trofoblasto para que no se produzca una proliferación descontrolada del mismo ([Cohen & Bischof, 2007](#); [Gude, Roberts, Kalionis, & King, 2004](#)).

El proceso de implantación se completa en la segunda semana. Y a partir de entonces se produce la diferenciación celular del embrioblasto. De la cuarta a la octava semana da comienzo la etapa de organogénesis, conocida como periodo embrionario y a finales del segundo mes, es posible distinguir los

principales caracteres externos del cuerpo. A partir de la novena semana de gestación comienza el periodo fetal, en el cual se produce la maduración de tejidos y órganos y el rápido crecimiento de las estructuras corporales del feto. Este crecimiento se da en primer lugar en longitud y en los dos últimos meses se produce la ganancia de peso del feto ([Moore et al., 2020](#); [Sadler, 2019](#)).

En las primeras etapas de gestación, el desarrollo embrionario es lento en relación con el desarrollo de la placenta. La formación de la placenta se da de forma activa en esta primera etapa, permitiendo así que se desarrolle como estructura de anclaje y comunicación para dar soporte a la demanda del embrión. Una vez que la placenta está suficientemente formada permite el crecimiento del embrión ([Rama & Rao, 2003](#)).

1.1.2 La placenta.

La placenta es un órgano transitorio de rápido desarrollo y muy especializado, que está localizado en la interfaz materno-fetal ([Rosenfeld, 2021](#)). Cumple funciones indispensables para dar soporte a la gestación, permitiendo el anclaje y desarrollo del embrión en un ambiente de protección ([Forbes & Westwood, 2010](#); [Yong & Chan, 2020](#)). Es una unidad autónoma y autosuficiente capaz de modular su propio desarrollo. A través de la placenta se establece una unión íntima materno-fetal mediante la cual, se produce el transporte de oxígeno y nutrientes al feto y la eliminación de productos de desecho del metabolismo fetal, además de actuar como una barrera de protección para el feto ([Abascal-Saiz et al., 2021](#); [Myatt, 2002](#)). Se trata de un órgano metabólicamente activo y con función endocrina siendo un punto de secreción de numerosas hormonas, citoquinas y factores de crecimiento ([Rama & Rao, 2003](#)). Es un órgano plástico capaz de acomodarse a las necesidades tanto del feto como de la madre a lo largo del embarazo, gracias a que se encuentra sometido a una estricta regulación. El primer trimestre es un periodo crítico para el desarrollo placentario y por ende embrionario y no es de extrañar, que existan diferencias entre la placenta de primer trimestre y la placenta a término ([Gude et al., 2004](#)).

La placenta a término tiene forma discoidea con un diámetro de 15-25 cm, un peso aproximado de 500 a 600 g y un espesor que ronda los 3 cm. En ella se pueden distinguir dos caras, como se observa en la **Figura 1**. La cara materna que se encuentra en el lado opuesto a la inserción del cordón umbilical, donde se observan los cotiledones rodeados de la decidua basal, separados por surcos donde se encuentran los tabiques deciduales; y la cara fetal, en la que se encuentra la inserción del cordón umbilical, de aspecto liso y brillante tras el alumbramiento. Se encuentra cubierta por la lámina coriónica y contiene numerosos vasos como las arterias y venas o los vasos coriónicos que irradian desde el cordón umbilical ([Sadler, 2019](#)).

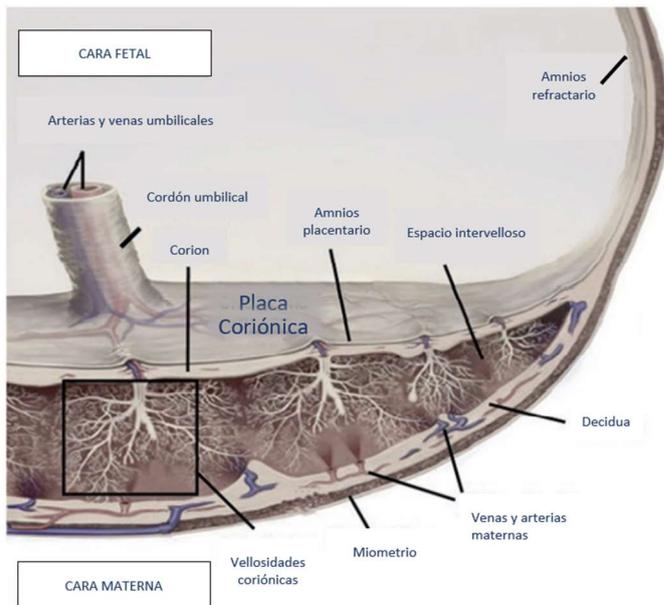


Figura 1. Sección de la placenta humana a término. Imagen tomada de ([Martínez & Damiano, 2017](#))

1.1.2.1 Desarrollo de la placenta.

El desarrollo de la placenta comienza tras la implantación del blastocisto en el epitelio endometrial, aproximadamente a partir de la segunda semana tras la fecundación, a partir del trofoblasto. Estas células sufren un proceso de diferenciación dando lugar al citotrofoblasto, o trofoblasto vellosos y el sincitiotrofoblasto o trofoblasto extraveloso ([Knofler, 2010](#)). El citotrofoblasto es una capa celular altamente proliferativa que dará lugar a las células que tras fusionarse generan el sincitiotrofoblasto. Este último es una masa multinucleada, que penetra en el tejido conjuntivo endometrial en un proceso de invasión que se encuentra en cierto modo controlado por las células endometriales y su capacidad de migración le permite remodelar las arterias uterinas, facilitando así el flujo sanguíneo al feto ([Gude et al., 2004](#)). A lo largo de la segunda semana se desarrolla el trofoblasto, creándose una red de comunicación entre la madre y el feto ([Whitley & Cartwright, 2010](#)).

Una de las características principales de la placenta es su carácter invasivo, particularmente en el primer trimestre, llegando a considerarse un tejido pseudotumoral, cuyo proceso de división acelerado debe estar altamente regulado. Una excesiva regulación del proceso de invasión del trofoblasto puede promover el desarrollo de patologías del embarazo como la preeclampsia. Por el contrario, el hecho de que se produzca un fenómeno de invasión descontrolado podría dar lugar a lo que se conoce como coriocarcinoma o una neoplasia trofoblástica gestacional ([Rama & Rao, 2003](#)). Uno de los factores que participan en la regulación de la invasión es la concentración de oxígeno. Al inicio de la gestación el ambiente en el que se desarrolla el embrión es claramente hipóxico y es esta situación de privación de

oxígeno la que promueve la invasión. Por el contrario, cuando la concentración de oxígeno aumenta, la invasión del trofoblasto se reduce notablemente ([Knofler & Pollheimer, 2013](#)).

Además del oxígeno, existen numerosas moléculas involucradas en los procesos de migración e invasión del trofoblasto como factores de crecimiento, citoquinas o moléculas angiogénicas. Estas moléculas pueden ser secretadas tanto por las células del trofoblasto como por las células maternas. Las células del trofoblasto están dotadas de distintas proteasas que degradan la matriz extracelular permitiéndoles su migración, en contrapunto, las células deciduales expresan distintas proteínas que controlan la invasión del trofoblasto. Un ejemplo claro de estos sistemas de invasión y contención es la expresión de las metaloproteasas por el trofoblasto e inhibidores de proteasas por las células deciduales entre otros ([Cohen & Bischof, 2007](#)).

A partir del primer trimestre, cuando ya se ha desarrollado por completo la placenta, ésta pierde el fenotipo invasivo y cumple con funciones de soporte como el transporte de nutrientes o la actividad metabólica y endocrina ([Rama & Rao, 2003](#)).

1.1.2.2 Transporte de nutrientes en la placenta.

El crecimiento fetal está relacionado con la disponibilidad de nutrientes de la madre y la capacidad de la placenta para transportar estos nutrientes. La transferencia placentaria de sustratos de la madre al feto esta modulada por la concentración de sustrato en la sangre materna y fetal. Existen distintos tipos de mecanismos de transporte de nutrientes en la placenta que dependerán del tipo de molécula que se transporte. Así el transporte puede ser por difusión pasiva, difusión facilitada, transporte activo, endocitosis o exocitosis ([Burton & Fowden, 2015](#)).

En el intercambio de moléculas participa el sincitiotrofoblasto que constituye el epitelio transportador de la placenta. Para que los nutrientes puedan acceder a la circulación fetal, es necesario que traspasen el epitelio capilar fetal, que actúa también como barrera a través de la cual, son capaces de circular moléculas como aminoácidos o glucosa ([Brett, Ferraro, Yockell-Lelievre, Gruslin, & Adamo, 2014](#)).

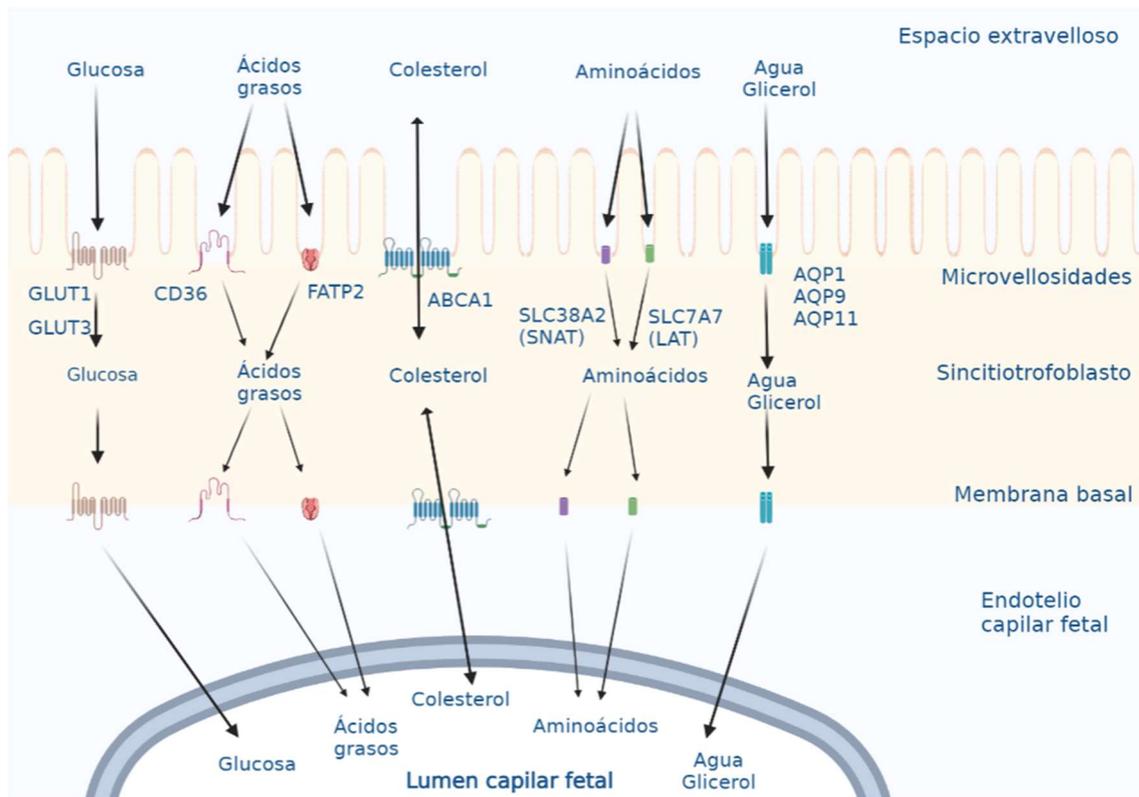


Figura 2. Transportadores de nutrientes en la placenta a término. Adaptado de ([Brett et al., 2014](#); [Martínez & Damiano, 2017](#)).

1.1.2.2.1 Transportadores de glucosa.

La glucosa es el principal sustrato energético para el feto. Además, a lo largo de la gestación, los requerimientos energéticos tanto de la madre como del feto e incluso de la placenta, varían, lo que requiere la modulación del intercambio de nutrientes. Los tejidos embrionarios tienen una baja actividad gluconeogénica y la difusión pasiva de glucosa no es suficiente para cubrir la demanda energética del feto. Por ello es necesario el transporte de glucosa materna a través de la placenta. Los transportadores encargados de cumplir con esta función son los denominados GLUT o SLC2 (del inglés *solute carrier family 2*).

En la placenta humana las isoformas mayoritarias de estos transportadores son GLUT1 y GLUT3 encontrando que su expresión en dicho órgano, varía a lo largo de la gestación y en función de su localización ([James-Allan, Teal, Powell, & Jansson, 2020](#)). La expresión de GLUT1 Y GLUT3 en el trofoblasto está regulada por la concentración de glucosa, por glucocorticoides e hipoxia. En células BeWo se ha visto que en condiciones de hipoxia la expresión de GLUT en la placenta y el transporte de glucosa, aumentan, lo que parece estar mediado por HIF-1. Sin embargo, esta asociación no se ha encontrado en estudios con explantes de placenta en condiciones de hipoxia ([Baumann, Zamudio, & Illsley, 2007](#)).

Según los datos disponibles del centro nacional de información biotecnológica (NCBI), *GLUT 1* se expresa fundamentalmente en placenta, si bien presenta diferencias en función de la zona, siendo mayor la expresión en las microvellosidades del sincitio que en la membrana basal, lo que permite mayor captación de la glucosa materna. La expresión en la membrana basal aumenta a lo largo de la gestación, mientras que en las vellosidades permanece inalterada ([Joshi et al., 2021](#)).

Existe controversia respecto a la expresión de *GLUT3* y su localización en la placenta, siendo además su expresión dependiente del momento de la gestación. Al contrario que *GLUT1*, la expresión de *GLUT3* en la placenta disminuye durante la gestación, siendo menor en el tercer trimestre, por lo que en la placenta a término se expresa más *GLUT1* que *GLUT3* ([Brown, Heller, Zamudio, & Illsley, 2011](#); [Xu et al., 2015](#)). La expresión de los transportadores GLUT en la placenta, en muchos casos se encuentra alterada en las patologías del embarazo, afectando directamente al desarrollo fetal ([Xu et al., 2015](#)). Además, se ha visto que las placentas procedentes de gestaciones por reproducción asistida presentan mayor expresión de *GLUT1*, *GLUT3* y *GLUT8* respecto a las gestaciones por reproducción natural ([Dong et al., 2019](#)).

1.1.2.2.2 Acuaporinas.

Las acuaporinas (AQP) son proteínas transmembrana que forman canales iónicos y permiten el paso de agua y moléculas polares a través de la membrana plasmática. En la placenta humana se han descrito 13 isoformas de acuaporinas. Las acuaporinas clásicas que permiten el paso de agua son la AQP0, 1, 2, 4, 5, 6 y 8. Las acuaporinas 3, 7, 9 y 10, transportan agua y solutos no polares como la urea y el glicerol ([Ducza, Csányi, & Gáspár, 2017](#)). Por último, la acuaporina 11, cuya función se ha descrito en los últimos años, es una proteína de membrana del retículo endoplasmático, involucrada en el transporte de peróxido de hidrógeno. Y la acuaporina 12 de la que aún no se conoce bien su función, aunque se ha relacionado con el daño pancreático en ratones ([Galli, Hameed, Żbikowski, & Zabielski, 2021](#)).

La expresión de estas isoformas y su distribución es variable a lo largo de la gestación. Las acuaporinas juegan un importante papel en el balance de fluidos entre la madre y el feto, regulando la homeostasis del agua durante el desarrollo fetal ([Pérez-Pérez et al., 2020](#)). Como comentamos anteriormente a través de alguno de estos canales se permite el paso de glicerol que participa en el balance energético fetal, además de activar distintas vías de transducción de señales ([Martínez & Damiano, 2017](#)); en otros casos se permite el paso de urea, por lo que participan también de forma indirecta en mecanismos de eliminación. Además se ha visto que las acuaporinas pueden estar implicadas en procesos de migración y apoptosis del trofoblasto ([Damiano, 2020](#); [Nong et al., 2021](#)).

La expresión de las acuaporinas en la placenta está regulada por distintos factores como la presión parcial de oxígeno, la presencia de hormonas, la presión osmótica o la temperatura, entre otros ([Y. Zhang, Ding, Shen, Wu, & Zhu, 2012](#)). Se ha descrito que la alteración en la expresión de acuaporinas en la placenta durante la gestación está relacionada con volúmenes anormales de líquido amniótico y el desarrollo de patologías del embarazo como la preeclampsia ([Hua et al., 2013](#); [Shao, Gao, Ying, Zhu, & Hua, 2021](#)).

1.1.2.2.3 Transportadores de ácidos grasos y colesterol.

El transporte de ácidos grasos de la madre al feto es indispensable para el correcto desarrollo fetal. Los ácidos grasos se translocan al sincitiotrofoblasto mediante proteínas de transporte FATP (del inglés, *fatty acid transport proteins*) y translocasas de ácidos grasos (FAT/CD36) (**Figura 2**). El transporte de ácidos grasos a la membrana basal del sincitiotrofoblasto también se lleva a cabo mediante proteínas de unión específicas de ácidos grasos FABP (del inglés *fatty acid binding proteins*) ([Kolahi, Louey, Varlamov, & Thornburg, 2016](#)). Se han descrito cinco isoformas de los transportadores FATP en la placenta humana. *FATP2* es la isoforma mayoritaria en la placenta a término, y se expresa tanto en la membrana plasmática del sincitio como en la membrana basal. Se ha visto que la expresión de *FATP2* en la placenta está relacionada con el receptor activado por proliferadores peroxisomales gamma (PPAR γ) ([Mishima, Miner, Morizane, Stahl, & Sadovsky, 2011](#)), hipoxia ([Jadoon, Cunningham, & McDermott, 2015](#)), sobrepeso y obesidad ([Lager et al., 2016](#)).

Las translocasas de ácidos grasos FAT/CD36 en la placenta, se localizan tanto en la cara materna como en la membrana basal de la capa de sincitiotrofoblasto ([X. Yang et al., 2019](#)). CD36 es una proteína integral de membrana de 88 kDa altamente glicosilada que, además de estar involucrada en el transporte de ácidos grasos, también se ha relacionado con procesos de angiogénesis, inflamación, arteriosclerosis y enfermedades cardiovasculares ([Duttaroy, 2009](#)).

Las proteínas encargadas del transporte de colesterol en la placenta son las proteínas transportadoras del casete de unión a ATP (ABC, del inglés *ATP-binding cassette*), es una superfamilia de más de 50 proteínas integrales, algunas de ellas con funciones diferentes. La expresión de las distintas isoformas en la placenta varía a lo largo de la gestación, siendo ABCA1 la isoforma mayoritaria en la placenta a término. ABCA1 se localiza en el endotelio y en las membranas apical y basal de la capa de sincitiotrofoblasto ([Fuenzalida et al., 2020](#)). Estos transportadores no solo están relacionados con el transporte de colesterol sino también de otras moléculas como hormonas, productos metabólicos y fármacos, entre otros. Se ha visto que la expresión de estos transportadores está relacionada con la edad gestacional ([Imperio et al., 2019](#)). Concretamente ABCA1 media el transporte de colesterol, fosfolípidos,

vitaminas y otras moléculas lipófilas y se encarga de la eliminación del exceso de colesterol celular, transfiriéndolo a las HDL, en un proceso mediado por la apoproteína A1, de ahí que se denomine ABC-A1. Además, se ha visto que ABCA1 media procesos antiinflamatorios y antiapoptóticos ([Chengmao et al., 2017](#)). La expresión del transportador ABCA1 está regulada por el receptor nuclear LXR (receptor X hepático), del que se ha observado una menor expresión en la placenta en la preeclampsia ([Kallol, Huang, Müller, Ontsouka, & Albrecht, 2018](#)).

1.1.2.2.4 Transportadores de aminoácidos.

Los aminoácidos son uno de los principales nutrientes de aporte al feto después de la glucosa. El aporte de aminoácidos en la placenta esta mediado por transportadores acumulativos y por proteínas transportadoras de aminoácidos. Los transportadores de aminoácidos se clasifican según su afinidad por el sustrato y su dependencia del sodio. Los transportadores del sistema A, que transportan aminoácidos neutros, como alanina, glicina y serina, con un transporte dependiente de sodio, se denominan SNAT (del inglés *sodium-dependent neutral amino acid transporter*) o SLC38A (de las siglas en inglés *solute carrier family 38*). La familia de transportadores del sistema L transportan aminoácidos neutros de forma independiente de sodio y favorecen el intercambio de aminoácidos no esenciales por aminoácidos esenciales. Estos transportadores se denominan LAT (del inglés *Large neutral amino acids transporter*) o SLC7A ([Lager & Powell, 2012](#)).

Los transportadores de aminoácidos que se encuentran de forma mayoritaria en la placenta a término son por un lado SNAT2 (SLC38A2), localizado en el sincitio, y por otro lado LAT1 (SLC7A5) y LAT2 (SLC7A8), ambos en las microvellosidades de la membrana orientada hacia la madre, pero además LAT2 se localiza en la membrana basal ([James-Allan et al., 2020](#)). La regulación de estos transportadores esta mediada por insulina y por la concentración de aminoácidos intracelulares. Además, los transportadores de la familia SNAT están regulados por otros factores como hormonas liberadas por la placenta (IL-6, factores de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF1), leptina o factores de necrosis tumoral (TNF- α) entre otros ([Aye, Jansson, & Powell, 2013](#)). Aunque los transportados mencionados son los mayoritarios en la placenta a término, también existe expresión de otros transportadores como SLC7A7 identificados tanto en la membrana basal (lado fetal) como en las vellosidades del sincitio (lado materno). En concreto SLC7A7 media el transporte de aminoácidos catiónicos o de L-aminoácidos grandes neutros, como la lisina, arginina y ornitina. La expresión de este transportador se ha relacionado con el desarrollo de patologías como la preeclampsia o la restricción del crecimiento intrauterino ([Huang et al., 2018](#)).

1.1.2.3 Metabolismo de la placenta

La placenta tiene sus propias demandas metabólicas y su propio consumo de nutrientes podría agotar el suministro de éstos al feto. Se estima que la placenta consume el 40% del oxígeno suministrado a la unidad feto-placentaria. El metabolismo placentario es glucolítico, dada la alta disponibilidad de este sustrato, ya que además del que llega de la circulación materna, las secreciones endometriales son ricas en carbohidratos y en glucógeno. En el metabolismo placentario de la glucosa predomina la glucólisis anaeróbica con formación de lactato, aunque los niveles de oxígeno favorecen la conversión de piruvato en acetil-CoA. Esto permite el suministro de lactato al feto, ya que la placenta no puede utilizarlo. Otro uso de la glucosa es a través de la vía de las pentosas-fosfato, la cual está estrechamente integrada con las vías de los polioles. Es necesaria para la síntesis de nucleótidos a su vez muy necesarios, dado lo rápido de la proliferación celular. Además, la vía de las pentosas-fosfato permite la regeneración del glutatión reducido potenciando así las defensas antioxidantes y manteniendo un control de los radicales libres. Esta preferencia del metabolismo no oxidativo permite una mayor disponibilidad de oxígeno para el feto junto con nutrientes, como el lactato ([Burton & Fowden, 2015](#)).

1.1.3 Metabolismo materno durante la gestación.

Los tejidos embrionarios durante su desarrollo se encuentran en un continuo estado anabólico. Las estructuras fetales son capaces de sintetizar moléculas a partir de precursores, pero se requiere el suministro externo de moléculas precursoras tales como monosacáridos, aminoácidos, ácidos grasos o glicerol entre otros. El aporte de nutrientes necesario para mantener el correcto desarrollo fetal lo proporciona la gestante gracias a la placenta, como se ha comentado anteriormente ([Herrera, 1978](#)). Por lo tanto, la madre es el soporte que garantiza el correcto desarrollo del feto, proporcionando un aporte adecuado de nutrientes y un entorno intrauterino favorable. Esto se consigue gracias a cambios anatómicos, fisiológicos y metabólicos que se producen en la gestante ([Herrera, 1999](#)).

Desde el punto de vista metabólico de la madre, la gestación se divide en dos etapas. Como se puede ver en la **Figura 3** hay una primera etapa que abarca los dos primeros trimestres de gestación, en la que la estructura feto-placentaria presenta un escaso crecimiento y el metabolismo materno es fundamentalmente anabólico. El objetivo de este anabolismo es aumentar las reservas maternas, preparándose para la etapa siguiente ([Herrera, 1988](#)). Para ello se produce un aumento en la ingesta de nutrientes en la gestante, o hiperfagia, un incremento en los niveles circulantes de insulina, así como una mayor sensibilidad a la insulina en los tejidos maternos. Todo ello promueve la captación y almacenamiento de sustratos, favoreciendo un aumento en las estructuras maternas ([M. P. Ramos, Crespo-Solans, del Campo, Cacho, & Herrera, 2003](#)). Esta reserva energética en la madre se produce

fundamentalmente, a expensas del glucógeno hepático, lo que favorece una hipoglucemia materna ([Herrera, 2000](#)) y del tejido adiposo, en el que se produce un aumento de la síntesis y del almacenamiento de lípidos, especialmente ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) de cadena larga ([Hadden & McLaughlin, 2009](#); [Herrera, Amusquivar, López-Soldado, & Ortega, 2006](#)). Además, durante la gestación la mujer presenta una marcada hiperlipemia, con altos niveles de triglicéridos y colesterol circulantes. La segunda etapa, que abarca el tercer trimestre de gestación, es el momento en el que se produce un crecimiento acelerado de la estructura feto-placentaria y el metabolismo materno es fundamentalmente catabólico ([Lain & Catalano, 2007](#)).

Como se ha comentado anteriormente, estos cambios permiten garantizar la disponibilidad de sustratos para el feto, ayudando a sostener su rápido crecimiento. El estado catabólico de la madre se produce gracias a una variación en los niveles de insulina y a una respuesta tisular a la insulina menor de lo habitual.

De esa manera, se evita la captación excesiva de glucosa en los tejidos maternos, se favorece la activación de la lipólisis provocando la liberación de ácidos grasos (AG), que podrán ser usados como sustrato energético por los tejidos maternos, y de glicerol, que podría ser transformado en glucosa por síntesis hepática. También disminuye el acúmulo de glucógeno, así como la actividad de la lipoproteína lipasa (LPL) ([Herrera, 1999](#)) y aumenta el catabolismo de proteínas.

En esta etapa además de producirse la movilización de nutrientes, se aumenta el transporte de estos a través de la placenta y se activan algunas rutas metabólicas como la cetogénesis y la gluconeogénesis, a fin de garantizar la disponibilidad de sustrato para el feto. ([Burton & Fowden, 2015](#); [Catalano, Huston, Amini, & Kalhan, 1999](#); [Herrera, 2000](#); [Herrera & Ortega-Senovilla, 2014](#); [Herrera, Palacin, Martin, & Lasuncion, 1985](#); [P. Ramos & Herrera, 1995](#)). Una suficiente disponibilidad de glucosa para el feto es fundamental ya que, a pesar de ser su principal fuente energética, el feto no tiene capacidad de llevar a cabo procesos gluconeogénicos ([Langdown & Sugden, 2001](#)). La cantidad de glucosa que le llega al feto a través de la placenta varía en función de las necesidades fetales y de la disponibilidad materna. Si se produce un aumento en la glucemia materna el paso de este nutriente a través de la placenta también se verá aumentado. Cuando al feto le llega una cantidad de glucosa alta se estimula la secreción de insulina por el páncreas fetal ([Herrera, 1999](#)), ya que ni la insulina materna ni la embrionaria atraviesan la placenta. Con el avance de la gestación la sensibilidad a la insulina de la madre cambia en función a los requerimientos fetales, desarrollándose una resistencia a la insulina como se ha comentado anteriormente, que se ve favorecida por el aumento de hormonas placentarias y maternas (estrógeno, cortisol, progesterona, leptina, lactógeno placentario, hormona de crecimiento placentario), que antagonizan la acción de la insulina y un estado de inflamación moderado del tejido adiposo ([Herrera, 1999](#); [Plows, Stanley, Baker, Reynolds, & Vickers, 2018](#); [Poulakos et al., 2015](#)). Las alteraciones en el

metabolismo lipídico y glucídico materno pueden afectar tanto a la madre como al feto, pudiendo contribuir al desarrollo de diabetes gestacional, restricción del crecimiento fetal, hipertensión o preeclampsia (Alvino et al., 2008).

1.1.4 Gestaciones gemelares

En las últimas décadas la prevalencia de embarazos gemelares ha sido del 3 al 5 % (Korb et al., 2020; Laine et al., 2019), habiendo aumentado debido a la utilización de las técnicas de reproducción asistida, principalmente a consecuencia del incremento de la edad materna (Okby, Harlev, Sacks, Sergienko, & Sheiner, 2018). Se ha visto que las gestaciones gemelares tienen mayor riesgo de complicaciones obstétricas y perinatales (Avnon, Ascher-Landsberg, Yogev, & Many, 2020).

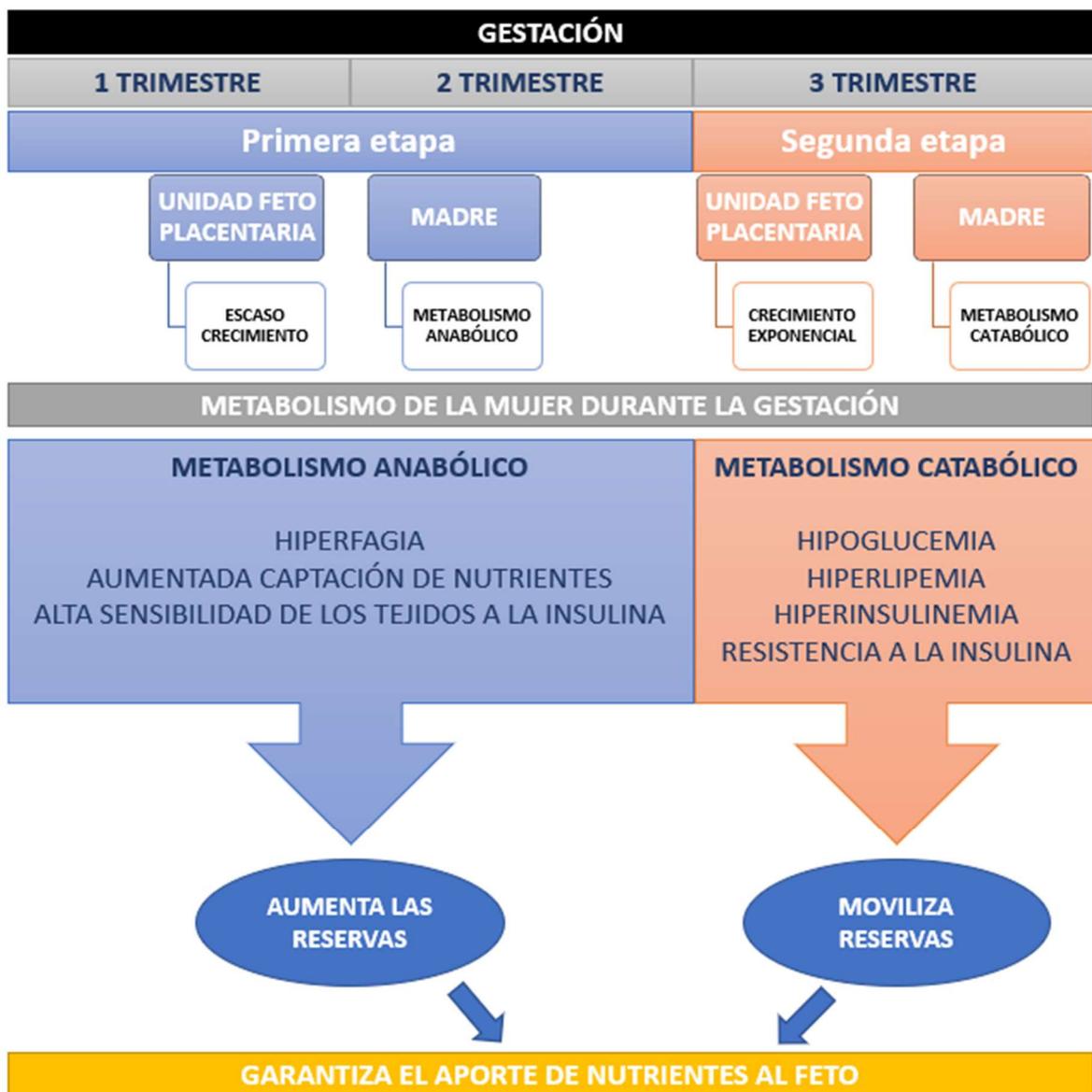


Figura 3. Esquema de las adaptaciones metabólicas maternas a lo largo de la gestación.

Existen distintos tipos de gestaciones gemelares, las monocigóticas y las dicigóticas. Las gestaciones dicigóticas que suceden en 70-75% de las gestaciones gemelares, son gestaciones dicoriónicas y diamnióticas que se producen por la fecundación de dos óvulos por dos espermatozoides, el resultado de ello son dos fetos con características genéticas diferentes. Por su parte, las gestaciones monocigóticas, se presentan en un 20-25% de las gestaciones gemelares, por lo que son menos frecuentes. En estos casos el óvulo es fecundado por un único espermatozoide y dará lugar a dos fetos de igual genotipo. Este fenómeno se produce durante la división celular tras la fecundación y dependiendo del momento en el que se produzca, dará lugar a los distintos tipos de gemelos monocigóticos: i) Dicoriónicos-diamnióticos, en este caso se produce la formación de dos embriones, dos placentas y dos cavidades amnióticas, por una división celular que tiene lugar a las 72 horas de gestación, ocurre en el 25% de los casos. ii) Monocoriónicos-diamnióticos, se desarrollan dos embriones, una placenta y dos sacos amnióticos. La división se da entre los días 3-8 posteriores a la fecundación, ocurre en el 70-75% de los casos; iii) Monocoriónicos-monoamnióticos se caracterizan por la formación de dos embriones, una placenta y un saco amniótico. Se produce a los 8-13 días. Ocurre en el 1-2% de las gestaciones gemelares ([Redline, 2003](#); [Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia, 2016](#)). Estas gestaciones presentan un alto grado de complicaciones sobre todo a nivel del cordón umbilical y anomalías congénitas. Presentando casi un 50% de mortalidad.

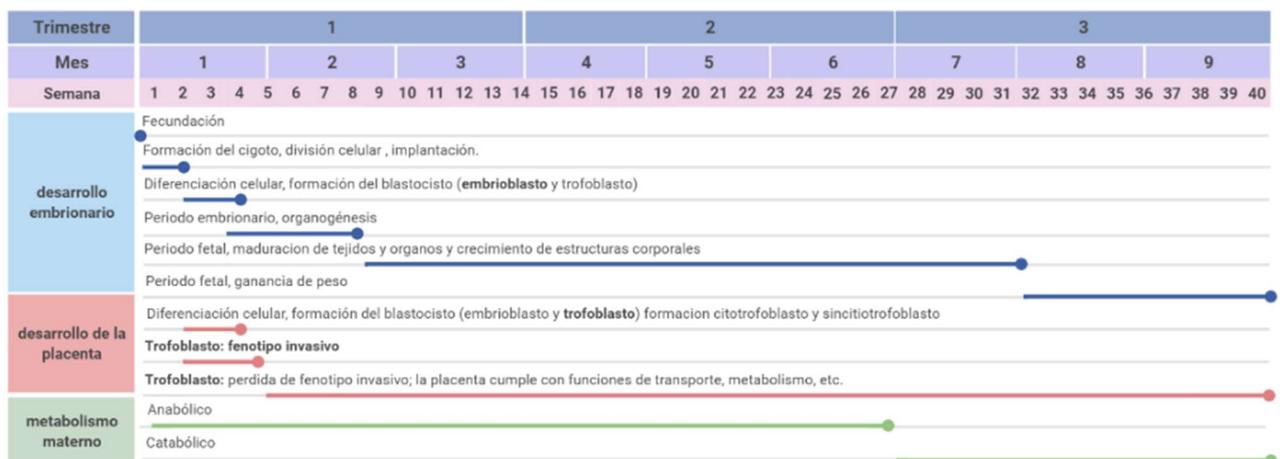


Figura 4. Esquema general de las etapas de la gestación.

1.2 PATOLOGÍAS DEL EMBARAZO.

Las patologías del embarazo son aquellas que aparecen por primera vez durante este periodo, suponiendo un riesgo tanto para la madre como para el feto. Aunque estas patologías suelen concluir en la mayoría de los casos después del parto, pueden condicionar la aparición de enfermedades en la vida futura tanto de la madre como del recién nacido ([Aryan, Medzikovic, Umar, & Eghbali, 2020](#); [Beetch & Alejandro, 2021](#)).

Aunque son varias las patologías que pueden aparecer durante el embarazo, la presente tesis se centra en la diabetes gestacional y en la preeclampsia, ya que son enfermedades con una alta prevalencia y su desarrollo supone un importante riesgo tanto para la madre como para el feto ([Eckstein et al., 2021](#)).

1.2.1 DIABETES GESTACIONAL.

La diabetes gestacional (DG), se ha definido como “cualquier grado de intolerancia a la glucosa que se identifica por primera vez durante el embarazo”. Es un tipo de diabetes que no existía antes de la gestación ([American Diabetes Association, 2021a](#)) y que actualmente se diagnostica en el segundo o tercer trimestre del embarazo. La diabetes gestacional es un importante problema de salud pública que afecta a uno de cada siete embarazos en el mundo ([Dłuski, Wolińska, & Skrzypczak, 2021](#)). Según la *International Diabetes Federation (IDF)*, la prevalencia de DG en 2021 en España era de un 32,8%, datos que se pueden observar en la **Figura 5**, donde se encuentra representada la prevalencia de DG en el año 2021 a nivel mundial. Las mujeres con antecedentes de DG tienen un riesgo del 60% de volver a desarrollarlo en embarazos posteriores ([Poulakos et al., 2015](#)). El incremento en la prevalencia de la DG se ha visto favorecido por el aumento de la obesidad, del sobrepeso y de los cambios en el estilo de vida ([Kopylov et al., 2020](#); [Zera & Seely, 2021](#)).

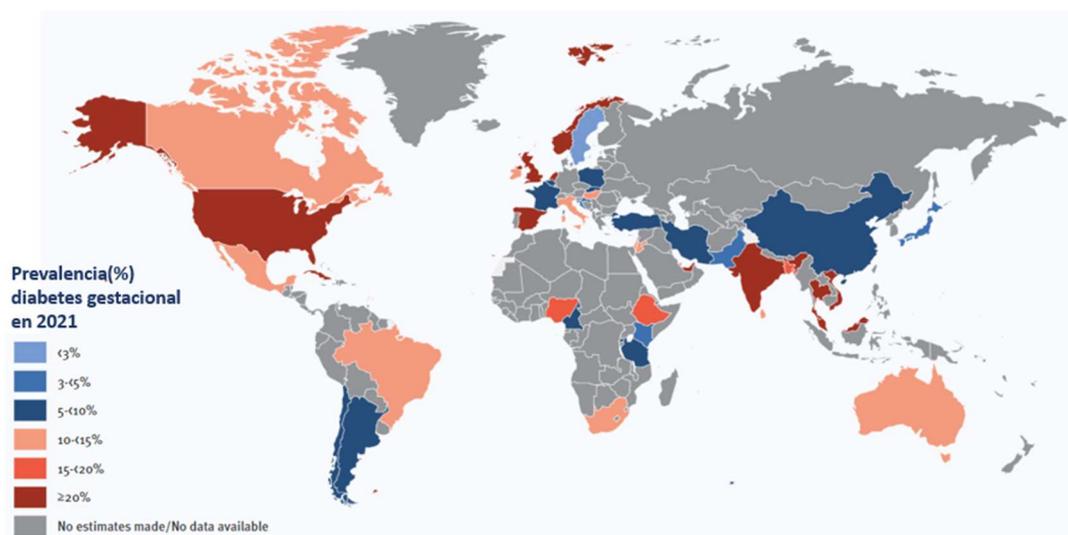


Figura 5. Prevalencia de diabetes gestacional en el año 2021. Datos tomados de la *International Diabetes Federation (IDF)*. Atlas de diabetes de la IDF 10ª Edición 2021.

1.2.1.1 Fisiopatología de la diabetes gestacional.

La diabetes gestacional está estrechamente relacionada con la diabetes tipo 2 (DM2), ambas tienen en común la característica clave de la patología que es la resistencia a la insulina ([Poulakos et al., 2015](#)). En este caso, la DG se desarrolla a consecuencia de una falta de adaptación por parte de los tejidos maternos a la resistencia a la insulina propia de algunas etapas de la gestación ([Leng, Zhang, Ren, & Li, 2019](#)). Lo que sucede en mujeres con esta patología es un proceso de hiperglucemia exacerbado, dado que los tejidos no son capaces de captar glucosa por una resistencia a la insulina inadecuada. Esta hiperglucemia estimula al páncreas a producir y secretar insulina provocando el estrés de las células beta pancreáticas, lo que desemboca en la disfunción de éstas ([Dalfrà, Burlina, Del Vescovo, & Lapolla, 2020](#); [Lorenzo-Almorós et al., 2019](#)). De esta forma, se genera un proceso cíclico de hiperglucemia, resistencia a la insulina y disfunción de células beta ([Plows et al., 2018](#)). En la mayoría de los casos, cuando se produce el alumbramiento, este proceso remite. Sin embargo, en algunos casos la DG predispone a estas mujeres al desarrollo de diabetes tipo 2 en el futuro ([American Diabetes Association, 2021a](#)), estimándose que, al cabo de 20 años, hasta el 70% de las mujeres que han padecido DG desarrollan diabetes tipo 2 en el futuro ([Dłuski et al., 2021](#)).

1.2.1.2 Factores de riesgo y consecuencias asociados a la diabetes gestacional.

La diabetes gestacional es una enfermedad multifactorial que puede verse afectada por factores epigenéticos como la metilación o los microRNA, por factores genéticos como polimorfismos, etnia, antecedentes familiares de diabetes o resistencia a la insulina, o enfermedades endocrinas como el síndrome del ovario poliquístico. Además, hay una clara influencia del estilo de vida, el sobrepeso, la obesidad, o la edad gestacional. Todos estos factores pueden contribuir a la alteración del ambiente intrauterino, condicionando así la programación fetal ([Plows et al., 2018](#)). El hecho de desarrollar diabetes durante el embarazo conlleva riesgos tanto para la madre como para el feto, a corto y a largo plazo, como se detalla en la **Tabla 1**. El riesgo está asociado al nivel de glucemia, por lo que es importante controlarlos, dado que cuanto mayor sean también lo será el riesgo ([American Diabetes Association, 2021b](#)).

La hiperglucemia materna provoca un mayor aporte de nutrientes al feto, fundamentalmente glucosa. La llegada de altos niveles de glucosa al feto estimula la producción de insulina fetal, que puede producir hiperinsulinemia fetal, disfunción de sus células beta y un proceso de resistencia a la insulina antes del nacimiento. Asimismo, se produce un aumento en el tamaño de las estructuras fetales, dando como resultado niños macrosómicos. Esta macrosomía supone además un riesgo de distocia de hombro y de parto por cesárea ([Tabrizi et al., 2019](#)). En el momento del parto el suministro de glucosa se detiene y se produce una hipoglucemia severa que puede desencadenar en un shock hipoglucémico del recién nacido, que puede producir lesiones cerebrales. Estos recién nacidos presentan mayor riesgo de muerte fetal y tienen mayor riesgo de desarrollar obesidad y diabetes en su vida adulta.

1.2.1.3 Diagnóstico.

El diagnóstico de DG es complejo ya que es difícil distinguir entre una hiperglucemia detectada por primera vez en el embarazo y una hiperglucemia previa pero no diagnosticada. Es importante ajustar y unificar los criterios diagnósticos, ya que existe controversia en la utilización de los mismos ([Pavic et al., 2021](#); [Zera & Seely, 2021](#)). A lo largo de los años se han utilizado distintos criterios diagnósticos, pero en la actualidad existen dos estrategias principales de diagnóstico establecidas por la ADA (*American Diabetes Association*). El diagnóstico de diabetes gestacional se realiza en un paso, con una prueba de tolerancia oral a la glucosa (OGTT) de 75g de glucosa, y en dos pasos, añadiendo un test de sobrecarga de 50g seguido de un OGTT de 100g para aquellas personas que den positivo en el anterior.

Tabla 1. Consecuencias de la diabetes gestacional

	EN LA MADRE	EN EL RECIÉN NACIDO	
A corto plazo	Preeclampsia Cesárea Complicaciones del parto	Hipoglucemia Hiperinsulinemia Hiperbilirrubinemia Macrosomía Distocia de hombro Traumatismo en el parto	Síndrome respiratorio neonatal Fetopatía diabética Aborto espontáneo Parto prematuro Muerte
A largo plazo	Diabetes tipo 2 Hipertensión Obesidad Enfermedades cardiovasculares Diabetes gestacional	Diabetes tipo 2 Hipertensión Obesidad	

Consecuencias maternas y fetales, a corto y largo plazo, del desarrollo de diabetes gestacional. Adaptado de ([Catalano et al., 1999](#); [Dalfrà et al., 2020](#); [Dias, Pheiffer, Abrahams, Rheeder, & Adam, 2018](#); [Kopylov et al., 2020](#))

Estas estrategias están basadas en el trabajo de la Asociación Internacional de Grupos de Estudio de la Diabetes y el Embarazo (IADPSG) siguiendo los criterios de O'Sullivan posteriormente modificados por Carpenter y Coustan ([American Diabetes Association, 2021a](#); [Metzger et al., 2010](#); [Moon & Jang, 2022](#)). Es importante distinguir una diabetes previa de una diabetes gestacional ya que se ha visto que la presencia de la hiperglucemia existente en el momento de la concepción conlleva mayor riesgo de malformaciones congénitas. Por otro lado, el riesgo que supone la DG tanto para la madre como para el feto está ligado a los niveles de hiperglucemia que se alcancen durante el embarazo, como mostró el estudio "Hyperglycemia and Adverse Pregnancy Outcome" (HAPO) ([Metzger et al., 2010](#); [Metzger et al., 2008](#)), por lo que un diagnóstico temprano permite minimizar los riesgos asociados a la enfermedad ([American Diabetes Association, 2021a](#)).

Dados los riesgos y consecuencias que genera la diabetes gestacional en la salud de la madre y del feto, es fundamental el correcto diagnóstico de la DG, por lo que sería de gran ayuda disponer de biomarcadores que permitieran no sólo el diagnóstico temprano de la patología sino conocer la predisposición al desarrollo de ésta ([Leng et al., 2019](#)).

1.2.1.4 Biomarcadores de diabetes gestacional.

Numerosos estudios han centrado su investigación en la identificación de posibles biomarcadores diagnósticos de la diabetes gestacional, dado que se trata de una patología muy relevante que implica un alto riesgo tanto para la madre como para el feto y su diagnóstico temprano puede ser fundamental para minimizar dichos riesgos. En estos estudios se han identificado marcas genéticas y epigenéticas que podrían utilizarse como potenciales biomarcadores. Para ello se han llevado a cabo estudios de genotipado de distintos polimorfismos en grupos de gestantes con y sin la patología, así como estudios en los que se han determinado distintas marcas epigenéticas como la metilación, modificación de histonas o el silenciamiento génico mediado por microRNAs ([Dalfrà et al., 2020](#); [Kim et al., 2017](#); [Valencia-Ortega, Saucedo, Sánchez-Rodríguez, Cruz-Durán, & Martínez, 2021](#); [Wei et al., 2021](#)). Otros estudios tratan de profundizar en el conocimiento del por qué las mujeres que desarrollan diabetes gestacional presentan un mayor riesgo al desarrollo de diabetes en su vida futura, intentando encontrar variantes genéticas asociadas con dicho riesgo. Así por ejemplo se ha encontrado como algunos polimorfismos como rs7903146 en el gen *TCF7L2* o rs8050136 en el gen *FTO*, parecen estar implicados en un mayor riesgo al desarrollo de DM2 tras el parto, en mujeres que desarrollaron DG ([Ekelund et al., 2012](#)).

En los últimos años ha cobrado gran importancia el estudio de los microRNA y su papel en distintas patologías. Los microRNA Tienen un papel fundamental en la regulación de la expresión de genes ([Singh, Maremanda, Li, & Rahman, 2020](#)) y participan en procesos de regulación de la proliferación, diferenciación, migración y apoptosis celular ([X. Zhao et al., 2020](#)). Los microRNA interaccionan con el extremo 3'-UTR del RNAm diana, y esta interacción impide la traducción o favorece la degradación de RNAm ([Guarino et al., 2018](#); [L. Yang et al., 2019](#)). Concretamente en relación con la diabetes gestacional, numerosos estudios han identificado microRNAs circulantes en la gestante que presentan una expresión diferencial entre mujeres con DG y mujeres con gestaciones no patológicas. La identificación de estos biomarcadores podría ayudar al diagnóstico temprano. Así, por ejemplo, en una revisión bibliográfica actual se ha descrito como en el suero de gestantes con DMG se observa una disminución de los niveles de hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-29a y hsa-miR-222. Posteriormente se identificó el gen 1 inducido por insulina (*INSIG1*), relacionado con la regulación de la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa 2 (*PCK2*), como diana de miR-29. Lo que sugirió la regulación negativa de la glucemia por parte de miR-29. Otros trabajos

encontraron aumentados los niveles de hsa-miR-518, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-19b-3p y hsa-miR-20a-5p ([Valencia-Ortega et al., 2021](#)). Por otra parte, hsa-miR-92a-3p vehiculado por vesículas extracelulares podría estar relacionado con el aumento a la sensibilidad a la insulina del músculo esquelético en DMG ([Nair et al., 2021](#)).

1.2.2 PREECLAMPSIA.

La preeclampsia es una complicación de la gestación de carácter multisistémico que afecta del 5 al 7% de los embarazos anuales a nivel mundial ([Jena, Sharma, Petitt, Maulik, & Nayak, 2020](#)). El desarrollo de preeclampsia supone una alta morbilidad y mortalidad tanto fetal como materna y contribuye a la prematuridad del feto y a enfermedad cardiovascular de la madre a largo plazo, entre otras complicaciones. La preeclampsia puede complicarse generando eclampsia. Aunque la tasa de aparición de preeclampsia es relativamente alta, afortunadamente en los últimos años se ha conseguido disminuir los eventos de eclampsia ([Nirupama, Divyashree, Janhavi, Muthukumar, & Ravindra, 2021](#)). El único tratamiento eficaz en ambos casos, hasta la fecha, es la inducción del parto ([Guerby et al., 2021](#)) aunque se está trabajando en nuevas estrategias terapéuticas que permitan retrasar la fecha prematura del parto.

1.2.2.1 Diagnóstico y sintomatología.

La preeclampsia se caracteriza por la aparición de hipertensión durante el tercer trimestre del embarazo en mujeres que, previamente a la gestación eran normotensas, y la presencia de proteinuria en la mayoría de los casos. Los parámetros clínicos utilizados para el diagnóstico de preeclampsia se especifican en la **Tabla 2**. La presencia de proteinuria como requisito para el diagnóstico utilizado clásicamente, se ha eliminado cuando aparecen daños en los órganos diana, como trombocitopenia, deterioro de la función hepática, insuficiencia renal, edema pulmonar o alteraciones cerebrales o visuales de nueva aparición.

En lo referente al diagnóstico de la enfermedad, no existen muchas alternativas a las anteriormente mencionadas, encontrándose centrado principalmente en el diagnóstico a partir de los síntomas ([Bakrania et al., 2020](#)). Actualmente, aunque aún no se utiliza en la práctica clínica, muchos autores defienden el uso de los niveles del factor de crecimiento placentario (PIGF) y tirosin quinasa I soluble similar a FMS (sFlt-1) como biomarcadores eficaces para el diagnóstico de la preeclampsia ([Stepan, Hund, & Andraczek, 2020](#)). Además, se ha visto que las gestantes con preeclampsia suelen presentar hiperlipemia e hipertrigliceridemia. Si embargo, los niveles de colesterol no suelen mostrar un perfil alterado ([Alvino et al., 2008](#)).

La preeclampsia se considera grave cuando se presenta una presión arterial mayor o igual a 160 / 110 mmHg en dos ocasiones distintas, o cuando el recuento de plaquetas es de $1,1 \text{ mg/dl}$ ($97,2 \text{ } \mu\text{mol/l}$), o si se produce una duplicación del nivel de creatinina sérica, edema pulmonar, alteraciones cerebrales o visuales de nueva aparición ([Phipps, Thadhani, Benzing, & Karumanchi, 2019](#); [Stepan et al., 2020](#)).

Tabla 2. Sintomatología y diagnóstico de la preeclampsia

SÍNTOMAS [PARÁMETRO]	SINTOMATOLOGÍA CLÍNICA
Hipertensión arterial [PAS $\geq 140\text{mmHg}$ o PAD $\geq 90 \text{ mmHg}$]	Visión borrosa
Proteinuria [$\geq 300 \text{ mg}$]	Edema
Insuficiencia renal [Creatinina sérica $> 1,1 \text{ mg/dL}$]	Aumento rápido de peso
Trombocitopenia [$<100.000 \text{ MI}$]	Dolor de cabeza, abdominal
Aumento de enzimas hepáticas [Duplicación de niveles normales]	Náuseas, vómitos

Criterios diagnósticos de preeclampsia, y síntomas relacionados. ([American College of Obstetricians and Gynecologists, 2020](#); [Chaiworapongsa, Chaemsaitong, Korzeniewski, Yeo, & Romero, 2014](#); [Founds, Tsigas, Ren, & Barmada, 2018](#); [Hong, Kim, Cha, & Park, 2021](#); [Nirupama et al., 2021](#); [Phipps et al., 2019](#); [Williams, 2011](#)).

1.2.2.2 Factores de riesgo y complicaciones.

Como factores de riesgo de preeclampsia se incluyen antecedentes familiares, predisposición genética, duración de la convivencia sexual, tabaquismo materno, número de embarazos, edad materna, uso de técnicas de reproducción asistida y afecciones médicas maternas como hipertensión preexistente, diabetes, enfermedad renal crónica y obesidad. También se asocian con un mayor riesgo de preeclampsia las afecciones que se asocian con un aumento de la masa placentaria, como las gestaciones multifetales y la mola hidatiforme y algunas alteraciones cromosómicas como la trisomía 13. Las complicaciones derivadas de la patología se recogen en la **Tabla 3**. La heredabilidad de la preeclampsia se estima del 55%, con contribuciones genéticas tanto maternas como fetales (del 30-35% y del 20%, respectivamente) ([American College of Obstetricians and Gynecologists, 2020](#); [Armaly, Jadaon, Jabbour, & Abassi, 2018](#); [Phipps et al., 2019](#)).

1.2.2.3 Fisiopatología y clasificación.

Pese a que la etiología de la preeclampsia no está del todo clara, numerosos estudios asocian su desarrollo a la disfunción de la placenta y de los tejidos maternos ([Robillard et al., 2017](#)) y apuntan a la placenta como órgano central de la patología ([Bakrania et al., 2020](#); [Myatt, 2002](#)). La fisiopatología de la preeclampsia está caracterizada por dos procesos, la placentación anormal y el desarrollo del síndrome

materno ([Phipps et al., 2019](#)). Ambos procesos conducen a la producción de factores que activan el endotelio materno produciendo en la gestante una inflamación vascular generalizada.

Tabla 3. Consecuencias de la preeclampsia

	MATERNAS	FETALES
A corto plazo	Coagulopatías Desprendimiento de placenta Fallo hepático Fallo renal Fallo respiratorio y edema pulmonar Edema cerebral y convulsiones Ictus Infarto agudo de miocardio Eclampsia Síndrome de HELLP Muerte	Oligohidramnios Nacimiento prematuro Restricción de crecimiento fetal Trastornos del desarrollo neurológico Muerte perinatal Muerte fetal
A largo plazo	Depresión, ansiedad y demencia Dislipidemias Enfermedad cardiovascular Enfermedad hepática Enfermedad isquémica Enfermedad renal Síndrome metabólico y DM2	Enfermedad cardiovascular Enfermedad inflamatoria Enfermedad metabólica Trastorno endocrino

Complicaciones maternas y fetales, a corto y largo plazo, relacionadas con el desarrollo de preeclampsia. ([American College of Obstetricians and Gynecologists, 2020](#); [Chaiworapongsa et al., 2014](#); [Founds et al., 2018](#); [Nirupama et al., 2021](#); [Phipps et al., 2019](#); [Williams, 2011](#))

Esta inflamación va a dar lugar a una disfunción endotelial materna causante de los síntomas característicos de la enfermedad como la hipertensión y la insuficiencia orgánica de la que deriva el resto de los síntomas como la proteinuria. Todo ello surge a consecuencia de un defecto en la remodelación de las arterias espirales, encargadas de una perfusión adecuada del flujo sanguíneo uteroplacentario. El defecto en la remodelación genera hipoxia placentaria ([Hong et al., 2021](#)). En función del momento en el que se presenta la sintomatología, la enfermedad se clasifica en dos categorías. Preeclampsia de aparición temprana (PE, de las siglas en inglés *early-onset preeclampsia*) y preeclampsia de aparición tardía (PL, de las siglas en inglés *late-onset preeclampsia*) (**Figura 6**).

En la preeclampsia temprana la sintomatología aparece antes de la semana 34 de gestación. Este tipo de preeclampsia está relacionada con problemas en el proceso de placentación. La preeclampsia de aparición temprana se asocia a una hipoxia placentaria que surge a consecuencia de la invasión anormal del trofoblasto, generando defectos en el desarrollo de las arterias espirales de la placenta. Cuando los síntomas se presentan a partir de la semana 34 de gestación se considera preeclampsia de aparición tardía.

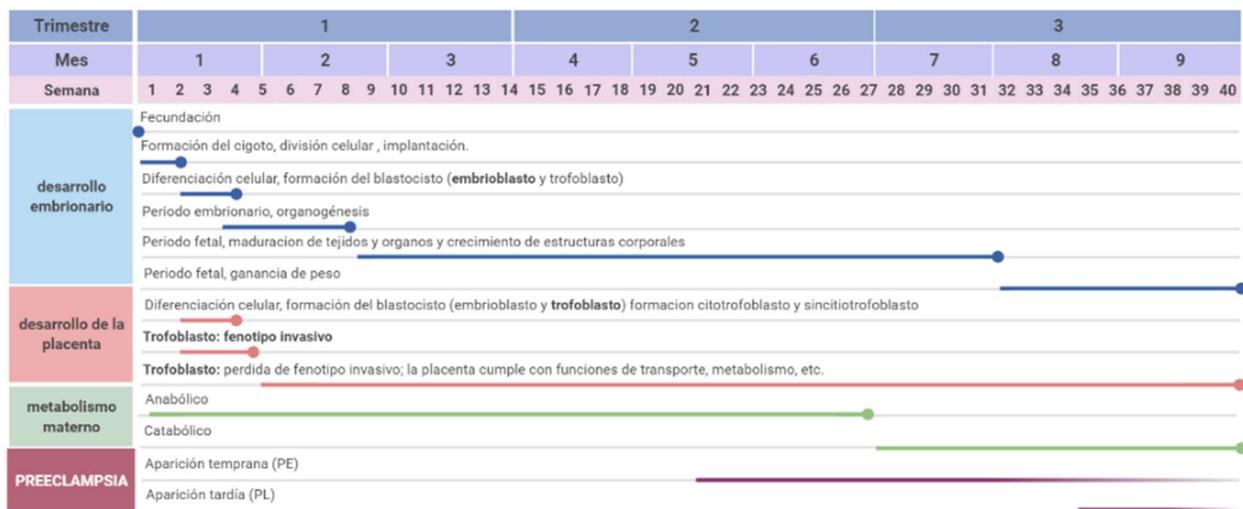


Figura 6. Esquema general de las etapas de la gestación. Diagnóstico y clasificación de preeclampsia (PE y PL).

En este caso, el desarrollo de la patología se asocia con el síndrome materno, pero no existe defecto en la placentación, sin embargo, se produce una mala perfusión placentaria causada por el hacinamiento de las vellosidades terminales cuando el crecimiento placentario excede los límites. Esta mala perfusión desencadena los procesos anteriormente mencionados provocando daño al endotelio materno ([Aneman et al., 2020](#); [Hong et al., 2021](#); [Jena et al., 2020](#); [Phipps et al., 2019](#)). La preeclampsia de aparición temprana tiene una prevalencia del 10% del total de las gestaciones complicadas con preeclampsia. Este tipo de preeclampsia suele ser más grave y está asociada a un fallo multisistémico severo ([Armaly et al., 2018](#); [Lisonkova et al., 2014](#); [Tarca et al., 2019](#)).

Las gestantes con preeclampsia presentan un estado proinflamatorio mediado por el aumento del factor de necrosis tumoral (TNF- α), e interleuquina 6 (IL6) y la disminución de interleuquina 10 (IL-10), así como un efeto pro-oxidativo en el que se elevan los niveles de especies reactivas de oxígeno y disminuyen las moléculas antioxidantes como la hemo-oxigenasa 1 (HO-1), la superóxido dismutasa (SOD), o la glutatión peroxidasa (GPx). Además, en la preeclampsia se desarrolla un evento anti-angiogénico, con niveles elevados de sFlt-1 (tirosina quinasa soluble similar a fms) y endoglina soluble (sEng) y niveles disminuidos de moléculas pro-angiogénicas como el factor de crecimiento placentario (PIGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el óxido nítrico (NO). Además, en estas gestantes se ha descrito el aumento del autoanticuerpo agonista del receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1-AA), la activina A y el factor inducible de hipoxia (HIF) ([Aneman et al., 2020](#); [Armaly et al., 2018](#); [Guerby et al., 2021](#); [Hong et al., 2021](#); [Jena et al., 2020](#)).

Dada la alta prevalencia de estas patologías y el riesgo asociado, son un importante problema de salud a nivel mundial. Por ello, es de enorme interés el profundizar en el conocimiento de las mismas a fin de encontrar posibles biomarcadores y dianas terapéuticas que permitan el abordaje temprano de la

enfermedad minimizando los riesgos que suponen tanto para la madre como para el feto y el recién nacido, a corto y largo plazo.

El presente estudio pretende profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de la preeclampsia, centrándose en la placenta como órgano principal de la patología. Por otro lado, el estudio de la diabetes gestacional va dirigido a la identificación de posibles biomarcadores diagnósticos que permitan realizar un cribado para una identificación y clasificación precoz de la enfermedad, a fin de abordarla en estadios tempranos, minimizando así el riesgo que supone.

2 HIPÓTESIS Y OBJETIVO

En base a los antecedentes mencionados, nuestra **hipótesis** apunta a que determinadas variaciones genéticas, tanto a nivel materno como a nivel placentario, podrían predisponer a la mujer a desarrollar patologías del embarazo y que su identificación se podría utilizar como biomarcador pronóstico o diagnóstico de las patologías obstétricas más prevalentes como la preeclampsia o la diabetes gestacional.

Para alcanzar esta hipótesis, el objetivo general de nuestro estudio consiste en la identificación de factores que podrían estar involucrados en el desarrollo de patologías del embarazo, así como identificar posibles biomarcadores que permitan el abordaje temprano de la enfermedad. Dado que el objetivo perseguido es muy amplio, se ha desglosado en los siguientes objetivos específicos:

Objetivo 1: Establecer la relación existente entre el momento en el cual se desarrolla la diabetes gestacional y ciertas variaciones genéticas, a fin de poder encontrar posibles biomarcadores de predisposición al desarrollo de la enfermedad. Este estudio se realizó, en colaboración con el Hospital Universitario La Paz de Madrid, en un grupo de mujeres con diabetes gestacional de aparición temprana (primer trimestre de gestación) y otro de aparición tardía (segundo trimestre de gestación), así como en mujeres sin diabetes gestacional utilizadas como grupo control. Para llevar a cabo este objetivo se realizó:

- 1.1. Un análisis de genotipado en de sangre materna, a fin de encontrar variantes genéticas predisponentes al desarrollo de la enfermedad que permitan el diagnóstico precoz.
- 1.2. La caracterización de microRNAs en plasma como posibles biomarcadores de diabetes gestacional.

Objetivo 2: Estudiar el nivel de expresión de ciertos genes en placenta humana de tercer trimestre. Dada la asociación de algunas patologías del embarazo con cambios en la estructura y función de la placenta, se plantea hacer un estudio de caracterización de la expresión génica en placenta humana de tercer trimestre procedente de partos no patológicos o de gestaciones complicadas con preeclampsia. Para conocer mejor el comportamiento de la placenta como órgano, se compararon diferentes partes de ésta, diferenciando entre cara materna y cara fetal. Este estudio se realizó, en colaboración con el Hospital Universitario La Paz de Madrid, en un grupo de mujeres con preeclampsia de diagnóstico temprano (anterior a la semana 34 de gestación) y otra de diagnóstico tardío (posterior a la semana 34 de gestación), así como en mujeres sin preeclampsia utilizadas como grupo control. Dicho estudio se abordó de la siguiente manera:

- 2.1. Estudio de expresión génica en distintas partes de la placenta tanto de gestaciones simples como de gestaciones múltiples en mujeres sanas.
- 2.2. Identificación del efecto de la preeclampsia, y del momento de su desarrollo, sobre la expresión génica en distintas partes de las placentas procedentes de gestaciones simples.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se describen los métodos generales de análisis de los distintos estudios incluidos en la tesis. Para facilitar la lectura y comprensión, las poblaciones analizadas, la toma de muestras y los criterios de inclusión se describen en cada uno de los estudios.

3.1 Secuenciación de DNA para el análisis de genotipado.

3.1.1 Aislamiento de DNA.

La obtención de ADN se llevó a cabo a partir de 500 µl de sangre periférica conservada en EDTA utilizando el kit Gentra Puregene Blood Kit de QIAGEN y siguiendo las instrucciones del fabricante. La sangre fue recolectada de 74 mujeres: 19 con diabetes gestacional de primer trimestre, 14 con diabetes gestacional de segundo trimestre y 41 controles.

3.1.2 Panel de genotipado.

Se estudiaron un total de 482 genes en un panel personalizado (MonDIABV4; SeqCap EZ-Capture, Roche) en el que se incluyeron las secuencias codificantes y los límites de intrones/exones (+/- 20 pares de bases, pb). Los genes incluidos estaban bien relacionados con la etiología de diferentes formas de disglucemia o asociados a ellas, o bien relacionados con la homeostasis de la glucosa. La secuenciación se llevó a cabo mediante tecnología Illumina, utilizando la plataforma HiSEQ 4000. En el **Tabla 4** se incluye el listado completo de los genes.

Las CNV (*variable copy number*) génicas e intragénicas se excluyeron con la herramienta bioinformática VarSeq CNV Caller (VarSeq V2.2.3; Golden Helix, MT, EE. UU.) ([Iacocca et al., 2017](#)). Todas las variantes notificadas se refieren al genoma de referencia humano GRCh37. Las variantes resultantes se filtraron y priorizaron según la evaluación de la calidad de la secuencia (Q mayor de 30; cobertura media superior a 90x, porcentaje la secuencia con cobertura mayor a 20x mayor del 80%). Así mismo se eliminaron todos aquellos con una frecuencia en la población menor del 1% en bases de datos de población ExAC, gnomAD, 1000G o ESP6500.

Este estudio se realizó en colaboración con el INGEMM –(Instituto de genética médica y molecular) del IdiPaz.

Tabla 4. Panel de genes analizado

ABAT	ABCA1	ABCBI	ABCB1	ABCC2	ABCC8	ABCG2	ACACA	ACAT2	ACADM	ACOX1	ACSL1	ACSL3
ACSL4	ACSM3	ACSS1	ACSS2	ACOX1	ADAMTSS9	ADCY5	ADCYAP1	ADCYAP1R1	ADIPOQ	ADIPOR1	ADIPOR2	ADRA2A
ADRB3	AGPAT1	AGPAT2	AIPL1	AKR7A2	AKT2	ALDH5A1	ALMS1	ARL15	ANGPTL4	ANK1	ANKRD55	AP3S2
APPL1	AQP1	AQP2	AQP3	AQP9	AQP11	AR	ARAP1	ARL15	ATP11A	ATP2A3	ATP4A	AVP
AVPR2	B3GALNT2	BANP	BCAR1	BCDIN3D	BCL11A	BCL2	BDNF	BLK	BMP2	BMP3	BRSK2	BSLC2
C17orf58	C1QTNF6	C2CD4A	CACNA1A	CACNA1B	CACNA1C	CACNA1D	CACNA1E	CACNA1F	CACNA1G	CACNA1H	CACNA1I	CACNA1S
CACNA2D1	CACNA2D2	CACNA2D3	CACNA2D4	CACNB1	CACNB2	CACNB3	CACNB4	CACNG1	CACNG2	CACNG3	CACNG4	CACNG5
CACNG6	CACNG7	CACNG8	CAPN10	CASR	CAV1	CAVIN1	CBS	CCKAR	CCL13	CCND2	CD36	CDC123/CAMK1D
CDKAL1	CDKN1C	CDKN2A/CDKN2B	CDKN2B	CEL	CENPW	CHCHD2	CIDEC	CILP2	CISD2	CLEC16A	CLK3	CMIP
CNR1	COBL	CP	CPT1A	CPT2	CREB1	CRY2	CTRB1/2	CTSH	CYP21A2	CYP27B1	CYP2C8	CYP2C9
CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4	DCAF17	DGKB	DHFR	DIS3L2	DLK1	DNMT3A	DNMT3B	DUSP9	ECA1	EIF2AK3
ENG	ENO2	ENPP1	ERBB3	ETV5	FADS1	FAF1	FAM105A	FASN	FFAR4	FN3K	FOXA1	FOXA2
FOXO1	FOXP1	FOXP3	FTO	FURIN	FUT2	FXN	G6PC2	GABBR1	GABBR2	GABRA1	GABRA2	GABRA3
GABRA4	GABRA5	GABRA6	GABRB1	GABRB2	GABRB3	GABRD	GABRE	GABRG2	GABRG3	GABRQ	GABRR1	GABRR2
GABRR2	GABRR3	GAD1+5'UTR+3'UTR	GAD2+5'UTR+3'UTR	GATA4	GATA6	GATAD2A	GCG	GCK	GCKR	GHRL	GHSR	GIP
GIPR	GJD2	GLIS3	GLP1R	GLP2R	GLRA1	GLUD1	GLY1	GNG5	GPAT4	GNPDA2	GPC3	GPR183
GPSM1	GRB14	GZMB	GZMH	HADH	HADHA	HES1	HFE	HHEX	HK1	HMG20A	HMG2A	HNFL1A
HNFB1	HNFA4	HRAS	HSD17B12	HYMAI	IERSIP1	IFIH1	IGF2BP2	IGFBP2	IGL4	IL10	IL10RA	IL12
IL2RA	IL6	IL6R	INS	INS-IGF2	INSM1	INSR	IRS1	IRS2	ISL1	ITLN1	ITLN2	JAZF1
KCNH8	KCNJ11	KCNQ1	KCTD15	KIF9	KL	KLB	KLF6	KLF11	KLF14	KLHL42	KMT2B	KMT2D
LEP	LEPR	LIPE	LIPG	LIPH	LMNA	LMNB2	LPIN2	LPL	LRAT	LYPLAL1	LYPLAL2	MACF1
MADD	MAFA	MAFB	MAT1A	MAT2A	MAT2B	MBOAT4	MC4R	MCF2L2	MEF2A	MEF2D	MEN1	MNX1
MOGAT2	MOGAT3	MPHOSPH9	MPI	MSRA	MTNR1B	MTR	MTHFD1	MTHFR	MYC	NDN	NEGR1	NEUROD1
NEUROG3	NFKB1	NFKB2	NKX2-2	NKX2-3	NKX6-1	NKX6-2	NKX6-3	NOS1AP	NOTCH2	NR4A3	NRXN3	NSD1
ONECUT1	OPAI	ORMDL3	PAX4	PAX6	PCBD1	PCK1	PCK2	PCSK1	PCSK9	PDX1	PGF	PGI
PGM1	PHOX2B	PKD1	PKLR	PLA2G1B	PLA2G2A	PLAGL1	PLAGL1-HYMAI	PLCXD3	PLIN1	PMM2	PNPLA3	POCIA
POMC	POU5F1	PPARA	PPARG	PPARGC1A	PPARGC1B	PPPIR1A	PRC1	PRKAA1	PRKAA2	PRKAB1	PRKAB2	PRKAG1
PRKAG2	PRKAG3	PRKCC	PROX1	PTEN	PTF1A	PTF1A-LCR	PTN	PTN	PTPN1	PTPN2	PTPN22	PTRF
PIY	RASGRP1	RBMS1	RBPJ	RBPJL	REL	RELA	RELB	RFWD2	RFX2	RFX3	RFX6	RNLS
RPGR	REB1	SEC16B	SERPINB3	SERPINB4	SERPINE1	SH2B1	SH2B3	SIMI	SIRT1	SKAP2	PTPN22	PTRF
PIY	RASGRP1	RBMS1	RBPJ	RBPJL	REL	RELA	RELB	RFWD2	RFX2	RFX3	RFX6	RNLS
RPGR	REB1	SEC16B	SERPINB3	SERPINB4	SERPINE1	SH2B1	SH2B3	SIMI	SIRT1	SKAP2	PTPN22	PTRF
SLC7A7	SLC12A5	SLC16A1	SLC16A7	SLC19A2	SLC22A1	SLC22A2	SLC22A3	SIMI	SIRT1	SKAP2	SLC2A1	SLC2A3
SLC30A8	SLC32A1	SLC32A1	SLC38A5	SLC38A2	SLC47A1	SLC47A2	SLC6A1	SLC22A8	SLC27A2	SLC29A3	SLC2A1	SLC2A2
SLC6A6	SLC6A6	SLCO1B1	SLCO1B3	SLCO4C1	SMARCE1	SNRPN	SOX17	SPATA7	SPRY2	SLC6A11	SLC6A13	SLC6A13
SST	SSTR2	SSTR5	STARD10	STAT4	STAT1	SYT13	TAGLN3	TFC1D4	TFPI2	SPTA1	SREBF1	SRR
TFAP2B	TH	THADA	THRB	TLE1	TLE4	TMEM18	TMPSR6	TNF	TNFAIP3	TNFRSF1A	TNFRSF1B	TP53INP1
TRMT10A	TSC2	TSPAN8/LGR5	TYK2	UBE2E2	UCP1	UCP2	UCP3	USH1C	VIPR1	VIPR2	VPS13C	WF51
WRN	WSCD2	ZACN	ZBED3	ZDHHC17	ZFAND3	ZFAND6	ZFP3	ZFP57	ZHX3	ZMIZ1	ZMPSTE24	

3.2 Identificación y análisis de miRNA en plasma de mujeres con y sin diabetes gestacional.

La determinación de los niveles de miRNAs circulantes se llevó a cabo en el plasma de las gestantes obtenido a partir de sangre recogida con EDTA. El flujo de trabajo, empleado fue el siguiente:



Figura 7. Esquema de flujo de trabajo empleado para el análisis de miRNAs circulantes en plasma de gestantes con y sin diabetes gestacional. Las muestras utilizadas en el estudio son muestras de plasma recolectadas en primer trimestre de gestación de gestantes normoglucémicas (control) mujeres que fueron diagnosticadas de diabetes gestacional en primer trimestre (DG1) y mujeres diagnosticadas de diabetes gestacional en segundo trimestre (DG2)

3.2.1 Aislamiento de miRNA para la secuenciación.

Previo al aislamiento del RNA y con intención de asegurar que las muestras no se encuentren hemolizadas, se llevó a cabo la determinación de la absorbancia de las muestras a 414nm. A esta longitud de onda la hemoglobina presenta un pico de absorbancia y su determinación permite garantizar la calidad de las muestras analizadas, ya que la hemólisis indicaría la contaminación del plasma con los miRNAs de las células sanguíneas.

El proceso de aislamiento de miRNAs se realizó a partir de 200 µl de plasma, para ello se utilizó el Kit *miRNeasy Serum/Plasma Advance* (QIAGEN, ref: 217204), siguiendo las instrucciones del fabricante. Para poder validar el éxito del aislamiento, se incluyó en cada una de las muestras un *pool* de miRNAs sintéticos denominados *Spike-in* (UniSP101, UniSP115, UniSP133, UniSP135, UniSP137, UniSP138, UniSP140, UniSP142). El producto de aislamiento se almacena a -80°C. La pureza y el rendimiento del mismo no se puede determinar dada la baja concentración de miRNAs en plasma. El protocolo de extracción detallado se especifica a continuación:

- Mezclar 200 µl de plasma con 60 µl de solución RPL.
- Agitar durante 5 seg e incubar 3 min a temperatura ambiente.
- Añadir 1 µl de *Spike-in* y 20 µl de la solución RPP, homogeneizar e incubar 3 min.
- Centrifugar 3 min a 12000 g.
- Transferir el sobrenadante, transparente e incoloro, a un tubo limpio y mezclar con un volumen de isopropanol.
- Transferir la mezcla a una columna *RNAeasy UCP MinElute Column*.
- Centrifugar 15 seg a 8000 g. Descartar eluido.
- Lavar la columna con 700 µl de solución de lavado RWT.
- Centrifugar 15 seg a 8000 g. Descartar eluido.
- Añadir a la columna 500 µl de solución RPE.
- Centrifugar 15 seg a 8000 g. Descartar eluido.
- Añadir a la columna 500 µl de etanol 80 %.
- Centrifugar 2 min a 8000 g. Descartar eluido.
- Secar la columna centrifugando la columna vacía a 5 min a velocidad máxima (12000 g en nuestro caso)
- Incubar la columna con 20 µl de agua libre de RNAsas 1 min a temperatura ambiente.
- Centrifugar 1 min a velocidad máxima (12000 g) para eluir.

Posteriormente y previo a la secuenciación, se llevó a cabo el control de calidad de las muestras. Para ello se determinaron los niveles de expresión de hsa-miR-451a y hsa-miR-23a-3p mediante RT-qPCR. Su presencia sería indicativa de la posible hemólisis en las muestras de plasma, provocando la contaminación con miRNA celular. Del mismo modo se analizaron miRNAs endógenos, hsa-miR-103a-3p, hsa-miR-191-5p, hsa-miR-451a, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-30c-5p. A todo ello y con el ánimo de validar la extracción y retrotranscripción, posteriormente a estos procesos se analizaron los *Spike-in* UniSP6, UniSP100, UniSP101. Estos análisis mostraron que todas las muestras seleccionadas para el estudio cumplían con los criterios de calidad establecidos que aseguran unos resultados óptimos en el proceso de secuenciación.

3.2.2 Secuenciación de miRNAs.

Una vez comprobada la calidad de las muestras y de las extracciones, se procedió a crear la librería para la secuenciación. La librería se preparó siguiendo el protocolo *QIAseq miRNA Library Prep kit*. La secuenciación se llevó a cabo mediante la tecnología Illumina, utilizando el equipo NextSeq500, llegando a alcanzar los 12 millones de lecturas por muestra. Después de mapear los datos y contar las entradas relevantes en mirbase_20, se calcularon los números de miRNA conocidos. Al realizar la comparación estadística de los grupos, se incluyeron todos los miRNA independientemente de la cantidad de lecturas realizadas.

Los niveles de expresión, habitualmente, se miden como etiquetas por millón de lecturas asignadas (TPM), utilizándose como unidad de medida de expresión, en el cual, el número de lecturas para un miRNA particular, se divide por el número total de lecturas mapeadas y se multiplica por 1 millón (Etiquetas por millón, TMM). Este es un procedimiento de normalización simple que corrige la profundidad de secuenciación y proporciona una medida de cantidad muy transparente para cada especie de RNA. El análisis estadístico de los resultados se muestra más adelante en el apartado (3.4.2). Donde se detalla el análisis de la expresión diferencial entre los grupos para cada miRNA.

3.2.3 Validación de los niveles de miRNA de plasma. Aislamiento de miRNA y análisis por RT-qPCR.

Para llevar a cabo la validación de los miRNA seleccionados, en base a los criterios anteriormente mencionados, se aíslan a partir del plasma de un mayor número de gestantes y a continuación se procede a su retrotranscripción para poder así analizarlos por RT-qPCR. Los resultados obtenidos se procesan para obtener una cuantificación relativa en cada muestra y posteriormente se lleva a cabo el análisis estadístico en el que se establecen las diferencias existentes entre los grupos. Los métodos utilizados se detallan a continuación.

3.2.3.1 Aislamiento de miRNA en plasma de mujeres.

El aislamiento de miRNA se realizó a partir de 200 μ l de plasma utilizando el kit *miRNeasy Serum/Plasma Advanced* (QIAGEN, ref:217204) siguiendo las instrucciones del fabricante. El protocolo detallado se especificó en el apartado 3.2.1. Para poder validar el aislamiento se incluyó en cada una de las muestras 1 μ l de un *pool* de miRNA sintéticos a distintas concentraciones comercializado por QIAGEN, *RNA Spike-in kit, UniRT* (Ref: 339390) este fue previamente reconstituido en 80 μ l de agua libre de RNAasa. Dicho kit incluye: UniSp2 (0,2 fmol/ μ l), UniSp4 (0,002 fmol/ μ l), UniSp5 (0,00002 fmol/ μ l).

3.2.3.2 Retrotranscripción de miRNAs para la obtención de DNA copia (cDNA)

Tras el aislamiento y dada la baja concentración e inestabilidad de los miRNA, todas las muestras se sometieron a un proceso de retrotranscripción para obtener cDNA con el que poder trabajar de forma estable. La retrotranscripción se llevó a cabo utilizando el kit *miRCURY LNA RT Kit* (QIAGEN, ref:339340), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Al no poder cuantificar los niveles de miRNA que se encuentran en el producto de aislamiento debido a su baja concentración que escapa al nivel de detección del espectrofotómetro se retrotranscribió el mismo volumen, 2 μ l, del producto de aislamiento de cada muestra. Dicho volumen, se mezcló con 2 μ l

de 5x *miRCURY RT Reaction Buffer*, 1 µl de 10x *miRCURY RT* (que contiene enzima, magnesio, dNTPs y *primer*), 0,5 µl de un *Spike-in* (UniSp6, que contiene 12 fmol de un miRNA sintético, que permitirá validar la retrotranscripción) y 4,5 µl de agua libre de RNAsa. Esto supone un volumen final de 10 µl, que serán sometidos en el termociclador, *Eppendorf Mastercycler Gradient 5331*, a 42 °C durante 60 minutos e inmediatamente después 5 minutos a 95 °C. El cDNA obtenido se diluyó con una proporción 1/10 en agua destilada libre de RNAsas y se almacenó a -20 °C.

3.2.3.3 Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

Para la validación de los resultados obtenidos del estudio de secuenciación se seleccionaron aquellos miRNA de interés en base a los criterios anteriormente mencionados y se utilizaron los *primers* proporcionados por QIAGEN (**Tabla 5**) para su validación mediante RT-qPCR. Se escogieron como *housekeeping*, dos miRNAs que no mostraban ninguna variación de expresión en los distintos grupos tras la secuenciación. Para validar que tanto el aislamiento como la retrotranscripción se había producido de manera uniforme en todas las muestras, se analizaron los miRNA sintéticos (*Spike-in*) incluidos en ambos procesos. Los *primers* diseñados por QIAGEN con este fin, son los siguientes: UniSp2, UniSp4, UniSp5 y UniSp6.

Tabla 5. Listado de primers utilizados para el análisis de microRNA.

Nombre del GEN	Nº de producto	Función
<i>UniSp2 miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP00203950	Spike-in
<i>UniSp4 miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP00203953	Spike-in
<i>UniSp5 miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP00203955	Spike-in
<i>UniSp6 LNA PCR primer set, UniRT</i>	YP00203954	Spike-in
<i>hsa-let-7g-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP00204565	constitutivo
<i>hsa-let-7d-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP00204124	constitutivo
<i>hsa-miR-1299 miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP02114891	miRNA diana
<i>hsa-miR-200a-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP00204707	miRNA diana
<i>hsa-miR-206 miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP00206073	miRNA diana
<i>hsa-miR-224-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP00204641	miRNA diana
<i>hsa-miR-23b-5p miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP00205873	miRNA diana
<i>hsa-miR-885-3p miRCURY LNA miRNA PCR Assay</i>	YP00204136	miRNA diana

De izquierda a derecha se muestra el nombre del miRNA, el número de producto del catálogo de la casa comercial (Qiagen) y la función que realiza dentro del estudio.

La reacción de amplificación incluye, 5µl de *buffer 2x miRCURY SYBR Green*, 1 µl de *primer*, 1 µl de agua destilada libre de RNAsas, y 3 µl de cDNA diluido 1/10. Lo que supone un volumen final de 10 µl, que se someterá en el termociclador, *CFX96 Real-Time PCR Detection System* de Bio-Rad, a un primer ciclo

de 2 minutos a 95°C y a continuación 40 ciclos, que constan de dos etapas, una primera de desnaturalización de 10 seg a 95 °C, y una segunda etapa de anillamiento y elongación de 60 seg a 56°C. Por último, se realiza un análisis de curva de *melting* desde 60 a 95°C.

3.2.3.4 Cuantificación relativa de los niveles de miRNA circulantes en plasma.

Para poder realizar la cuantificación relativa de los niveles de miRNAs en las distintas muestras, se analizaron los niveles de dos miRNAs constitutivos seleccionados, a los cuales se van a referir los niveles de expresión del resto de miRNAs. Los resultados obtenidos serán analizados por el método de *Livak (Pfaffl, 2001)*. Se realizó la media geométrica de los valores de expresión de los genes constitutivos y se analizó la expresión en base a ellos. El tratamiento estadístico de estos datos se especifica en el apartado **3.4.3.**

3.3 Análisis de cuantificación de mRNA en placenta de tercer trimestre

El análisis de expresión génica en placenta de tercer trimestre tiene por objetivo la cuantificación de productos génicos, RNA mensajero y proteínas, de algunos genes de interés. Para ello es necesario, por un lado, aislar el RNA total del tejido, retrotranscribirlo y posteriormente analizarlo específicamente por RT-qPCR. Por otro lado, es necesario aislar la proteína del tejido y analizarla específicamente mediante western-blot.

Los resultados obtenidos en todos los casos son procesados de manera que se obtiene una cuantificación relativa de todos ellos. Las diferencias existentes entre los resultados obtenidos en los distintos grupos serán analizadas estadísticamente. El estudio se realizó siguiendo las pautas de MIQE para garantizar la calidad de la cuantificación y posterior comparación (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) ([Bustin et al., 2009](#)).

3.3.1 Aislamiento de RNA de placenta de tercer trimestre

Se realizó el aislamiento de RNA de placenta a partir de 25-30 mg de tejido. El método de extracción escogido garantiza la preservación de la integridad del RNA en comparación con otros métodos ([Sabén et al., 2014](#)). El tejido se homogeneizó con 1 ml de *Qiazol* en el *TissueLyser LT* (Qiagen) mediante dos ciclos de 4 minutos a 50 Hz, asegurando la completa disgregación del tejido. Tras una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente se añadió 200 µl de cloroformo que dejamos reposar 2-3 minutos a temperatura ambiente posteriormente se agitó en vortex 15 seg para obtener el homogenado. Dicho homogenado se centrifugó a 12.000g y a 4°C, durante 15 minutos, con el objetivo de separar físicamente

el RNA de otras macromoléculas presentes en la placenta. El sobrenadante obtenido tras la centrifugación (aprox. 500 µl), en el que se encuentra el RNA, se mezcló con 600 µl de etanol al 70% frío y posterior elución.

Para asegurar una pureza adecuada en el proceso de aislamiento se utilizó el kit de aislamiento y purificación de QIAGEN, *RNeasy Mini Kit*. El sobrenadante del homogenado, mezclado con etanol frío al 70%, se transfirió a la columna del kit y se centrifugó 15 seg a 8.000g en la microcentrífuga eppendorf, de esta manera el RNA quedará fijado a la matriz de la columna. Se eliminó el eluido y se añadieron 350 µl de solución *RW1* a la columna, que posteriormente se centrifugó 15 seg a 8.000g. Sometemos a la muestra, una vez fijada a la columna, al tratamiento con DNAsas para eliminar la posible contaminación con DNA en el aislamiento. Para ello incubamos con DNAsa reconstituida en el momento de la utilización, según las especificaciones del protocolo, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Trascurrido este tiempo se añadió 350 µl de *RW1* y se centrifugó durante 15 seg a 8.000g. Posteriormente se añadieron 500 µl de solución *RPE* y se centrifugó 15seg a 8.000g, repetimos este paso, pero esta vez centrifugamos 2 minutos. Estas etapas posteriores al tratamiento con DNAsa son etapas de lavado, que aseguran la eliminación de impurezas. Por último, centrifugamos la columna vacía a velocidad máxima durante 1 minuto, para eliminar los posibles restos de etanol que pudieran quedar, y se eluyó con 40 µl de agua destilada estéril libre de RNAsas, centrifugando durante un minuto a 8.000g.

Determinación de la pureza y el rendimiento del aislamiento de RNA.

Una vez aislado el RNA del tejido, comprobamos la concentración de RNA obtenida y su pureza. Para ello analizamos por espectrofotometría la absorbancia que presentan los productos de aislamiento obtenidos para cada muestra. El equipo utilizado para la lectura de absorbancia es el espectrofotómetro de UV-visible, de *GE Healthcare, NanoVue Plus*. Para valorar la pureza se determinó la absorbancia a 230, 260 y 280 nm y se analizó el ratio 260/280 y 260/230. Considerándose óptimos resultados del ratio 260/280 que se encuentran entre 1.8 y 2.0, y entre 2.0 y 2,2 para el ratio 260/230.

A continuación, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1,4% para comprobar la integridad del RNA de las muestras tras el aislamiento. Para el análisis se cargaron 2 µl RNA aislado por muestra. Para su visualización se reveló con 2 µl *PRONASAFE Nucleic Acid Staining* de Condalab, en el transiluminador *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad).

3.3.2 Retrotranscripción del RNA aislado para la obtención de DNA copia (cDNA)

Tras el aislamiento y dada la inestabilidad del RNA, sometimos a todas las muestras a un proceso de retrotranscripción para obtener cDNA con el que poder trabajar de forma estable. Dado que el número de muestras a procesar era elevado, se prepararon 4 tandas de muestras, en cada una de las tandas se incluyó un control negativo, un pool de todas las muestras de RNA que actuaría como control interno y además alguna de las muestras repetidas para validar la reproducibilidad en cada proceso de retrotranscripción. En cualquier caso, el número de muestras incluidas por tanda de retrotranscripción constaba del mismo número de muestras de cada grupo, luego los grupos estaban representados de forma homogénea entre las distintas tandas.

Se retrotranscribieron 3µg de RNA utilizando el kit de retrotranscripción de *Thermoscientific, RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit*. Lote 00501295. 30-07-2019. Siguiendo las especificaciones del fabricante. Utilizando por cada reacción: 1µl de *RANDOM primers*, 4µl *Reaction buffer*, 1µl *Ribolock*, 2µl dNTPs (10mM) y 1µl *Revertaid*. Se ajustó el volumen de RNA aislado con agua destilada libre de RNAsas, hasta conseguir un volumen final de 11 µl, que contuvieran de forma exacta 3 µg de RNA. Los ciclos de retrotranscripción se llevaron a cabo en un Termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* 5331. El programa utilizado consta de tres etapas: una etapa inicial de 5 minutos a 25°C, seguida de 60 minutos a 42°C y 5 minutos a 70°C. El cDNA resultante se diluyó en proporción 1/30 con agua destilada estéril y se almacenó a -20°C.

3.3.3 Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

El estudio de expresión génica se realizó mediante RT-qPCR que nos permite identificar de forma específica la cantidad de mRNA de interés presente en el tejido de partida. Para el análisis se utilizó, *QUANTIMIX EASY KIT 1000* (10606), Biotools. En cada reacción se añadió: 7,5 µl *QUANTIMIX*; 2,5 µl de agua destilada estéril; 2 µl de una mezcla de PF (1 µM) y PR (1 µM). El termociclador utilizado para el estudio fue el *CFX96 Real-Time PCR Detection System* de Bio-Rad. El programa utilizado consta de una etapa de desnaturalización previa a 95°C durante 9 min, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C 10 s, anillamiento cuya temperatura fue optimizada en cada caso (las temperaturas de anillamiento se muestran en la **Tabla 6**) y elongación a 72°C durante 45 s. Tras los ciclos de PCR se realizó una curva de *melting*.

Para cada gen estudiado se seleccionaron los *primers* más adecuados. Estos *primers* se diseñaron utilizando el programa gratuito *primer-BLAST* y en algunos casos se obtuvieron de referencias bibliográficas. Las propiedades termodinámicas de los *primers* se analizaron utilizando el programa *Beacon*

Designer™, comprobando que no se producían estructuras secundarias por complementariedad que mermaran la eficiencia del *primer*, generando dímeros. Se comprobó que la temperatura de anillamiento de los *primers* era adecuada, así como el tamaño del fragmento obtenido, y la inexistencia de uniones inespecíficas con otras regiones del genoma.

Los *primers* seleccionados se pusieron a punto en cada caso, optimizando la temperatura de anillamiento mediante la elaboración de una RT-qPCR en gradiente, en la que se analizaron distintas temperaturas de anillamiento. El análisis del producto de la PCR en gradiente se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, revelado con *PRONASAFE Nucleic Acid Staining* de Condalab, en el transiluminador *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad).

Esto nos permite comprobar que el tamaño del fragmento obtenido es el esperado y seleccionar la temperatura de anillamiento óptima en la que se obtiene mayor rendimiento y mayor especificidad, evitando escoger temperaturas de anillamiento a las que pueda producirse la unión inespecífica del *primer*. Las secuencias de *primers* utilizadas, así como su temperatura de anillamiento y la eficiencia los mismos se muestran en la **Tabla 6**.

Una vez seleccionada la temperatura de anillamiento de cada pareja de *primers* se procedió al análisis de la eficiencia de cada una de ellas. Para analizar la eficiencia de los *primers* seleccionados, se elaboró una recta de calibrado con distintas diluciones de un *pool* de cDNA de todas las muestras, cada dilución fue amplificada y analizada. La amplificación de distintas cantidades de cDNA nos permite, por un lado, observar el nivel global de expresión del gen que estamos analizando en las muestras de estudio.

Con el resultado de dichas amplificaciones de concentraciones decrecientes se obtiene una recta cuya pendiente se utiliza para calcular la eficiencia de la amplificación mediante la fórmula ($E=10^{-1/\text{pendiente}}$) (Pfaffl, 2001). De esta manera podemos optimizar la cantidad mínima y máxima de cDNA que podemos usar para el análisis de expresión, asegurando que amplificamos una cantidad detectable del mismo. Si la eficiencia se acerca al 100 %, podemos afirmar que en cada ciclo de PCR se duplica el material genético de partida de forma proporcional. El cálculo de la eficiencia y la optimización de la temperatura de anillamiento de cada pareja de *primers* nos permitirá llevar a cabo un adecuado uso de los datos.

3.3.4 Cuantificación relativa del nivel de mRNA.

Para poder realizar la cuantificación relativa de la expresión génica, se analizó la expresión de dos genes constitutivos: el gen que codifica para la proteína ribosomal L30 (*RPL30*) y el gen que codifica para la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*) (Vandesompele et al., 2002), a los cuales se van a referir los niveles de expresión (St-Pierre, Grégoire, & Vaillancourt, 2017).

Tabla 6. Listado de primers utilizados para el análisis de mRNA en placenta.

GEN	Primer Forward	Primer Reverse	T ^a anillamiento (°C)	Eficiencia (%)
GAPDH	TGCACCACCAACTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG	61	97,6
RPL30	AAGACGAAAAAGTCGCTGGA	AAAGCTGGGCAGTTGTTAGC	60	91,2
SLC2A1 (GLUT 1)	ACTCCTCGATCACCTTCTGG	ATGGAGCCCAGCAGCAA	63,3	83,5
SLC2A3 (GLUT 3)	TTGAACACCTGCATCCTTGA	GACAGCCCATCATCATTTCC	55,7	104
AQP1	CTGGCTGATGGTGTGAACTC	AAGGACCGAGCAGGGTTAAT	58,5	94,2
AQP9	TGCCATTTTATGTGGGAGCC	AATGCGTTCGCCAGAGATAG	61	103,4
AQP11	CCCAGTATCACGTCAGCGAG	GTAGCGAAAGTGCCAAAGCTG	61	100,1
SLC27A2 (FATP2)	TGGGAAATGGCTTACGAGGA	TCTCCAACCTGTGCTGGAA	60	96,7
CD36 (FAT)	TGTCCTGGCTGTGTTGGAG	AGACTGTGTTGTCCTCAGCG	60	97,7
ABCA1	TGGCACTGAGGAAGATGCTC	TGTTACCTCAGCCATGACC	61	94,2
SLC38A2	TGGTACTTCGCTCATCAGGC	AAGGGCAAACCYACAGCCA	60	93,8
SLC7A7	GGAAGTGGGCACCACCATTA	TCTTGTACCAGGGTCCCA	61	96,3
LCHAD	ATCAAATCAGAAGTGCCGTCCT	CTCCAGGCAGGATCCATTG	62	96,1
MCAD	ACCAAGTATGCCCTGGAAAGG	CGACCAGAATCAACCTCCCAA	62	99,8
CPT1A	TTCAGTTCACGGTCACTCCG	TGACCACGTTCTTCGCTG	61	93,9
CPT2	TTGAAGACACCATTAGGAGATACC	CCAGCTGCTCATGCAGTTCTTTT	60	91,1
ACOX1	TCACCTCTGGACTGCAAAC	ACTGGGCAGGTCGTTCAAAT	60	94,6
ACSS1	CAGGCTACCTGCTCTATGCC	TTCTTCACCCAGGCATCACC	60	93,2
ACSL3	GTTTGGATGGTTTGGCTCAGT	TGCAGCTATCATCCACTCGG	61	93,6
ACSL4	TGTTATGAGCAAAGTCCAAGAGATG	GTGTCTGAGGAGATAGCGGG	60	80
ACSM3	CTTGCAAATGTGGCCTGTCT	TGGATGCAACAGCGTCTACT	60	93,7
ACACA	GGACAGTGAAAACCCCTTCA	ATTCTAACAGGAGCTGGAGCC	61	93,6
LPIN2	CACAGTGACAATCACCTGCC	CGTACCCAGCCAGAGAAGAA	60	94,4
GPAT4	TAAGGCTCTGGACAACACTCC	ACCACCAGAAGGCTAATCCC	58,2	109,5
CBS	CTGGCTCACTACGACACCA	AGCATGTCCAGTTCCCAT	60	118,2
PI3K-R	TGAACGAGTGGTTGGGCAAT	CCCTGTTTACTGCTCTCCCG	60	90,4
PTN	ACAATGCCGAATGCCAGAAG	AGGTTTGGGCTTGGTCAGTT	56	96,8
PGF	GGAGCACATGTTTACGCCAT	AACGTGCTGAGAGAACGTCAG	60,5	98
ENG	AGTCCCAGACACCTCAA	TCCGGGCTACAAGTGCCTT	61,4	83,1
sFLT1	TCAGCAGTCCACCCTTTAGA	TATACAGTTCAGGCTTGTGT	56,5	93,9

De izquierda a derecha se muestra el nombre del gen, la secuencia del primer forward, la secuencia del primer reverse, la temperatura de anillamiento de los primers y su eficiencia.

Los resultados obtenidos se analizaron por el método *Livak*, dado que la eficiencia de los *primers* utilizados se encuentra dentro de los valores establecidos para la utilización de este método (Pfaffl, 2001). Se utilizó la media geométrica de los valores de expresión de los genes constitutivos para poder determinar la expresión relativa de todos los genes estudiados.

3.3.5 Cuantificación de proteína mediante *western-blot* (WB)

Para la cuantificación de proteínas mediante *western-blot* fue necesario en primer lugar aislar la proteína total. En algunos casos fue necesario el aislamiento previo de la membrana plasmática para una mejor detección de las proteínas de membrana. Tras un pretratamiento, se procedió a la separación de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y a continuación fueron transferidas a una membrana de PVDF. La detección específica de la proteína de interés se realizó mediante inmunodetección y posterior revelado por quimioluminiscencia. Los resultados fueron densitometrados para obtener la cantidad relativa de proteína en la muestra. Posteriormente para identificar las diferencias en los niveles de proteína en los distintos grupos se realizó el análisis estadístico. La metodología utilizada en detalle se muestra a continuación.

3.3.5.1 Aislamiento de membrana plasmática.

Para poder estudiar las proteínas de membrana se aislaron las membranas plasmáticas de 20-50 mg de tejido, utilizando una solución hipotónica de TRIS 10mM y EDTA 2,5mM. Se añadió a cada muestra 1600 µl de tampón de lisis hipotónico y se homogeneizó en el *TissueLyser LT* (Qiagen) con agitación a 45 Hz durante 4 minutos, seguido de 15 minutos de reposo en hielo. El homogenado obtenido se separó en dos tubos, quedando un volumen aproximado de 800 µl por tubo a los que se añadieron otros 800 µl de tampón de lisis. Ambos tubos se volvieron a homogeneizar por agitación en el *TissueLyser LT* (Qiagen) con agitación a 45 Hz durante 4 minutos, seguido de 15 minutos de reposo en hielo. Tras comprobar que se había producido la disgregación completa del tejido, se centrifugó a 1500g durante 4 minutos a temperatura de refrigeración. Se recogió el sobrenadante en un tubo y el pellet se lavó dos veces con 500 µl de tampón de lisis, centrifugando en refrigeración a 1500g durante 4 minutos. Todos los sobrenadantes se aunaron en un mismo tubo, con el fin de aumentar el rendimiento en el aislamiento de las membranas. El sobrenadante se centrifugó a 17.000g durante 30 minutos a temperatura de refrigeración. El pellet obtenido, se resuspendió en 300 µl de tampón de lisis, consiguiendo así un aislado de membrana plasmática de cada muestra.

3.3.5.2 Aislamiento de proteína total o proteínas de membrana.

Para el aislamiento de proteína total en el tejido, en primer lugar, se homogeneizaron entre 30-60 mg de placenta de tercer trimestre con 750 µl de *RIPA buffer* (EDTA 5mM, TRITON X-100 1%, SDS 1%, NaCl 150mM y *Pefablock* (Roche) 2mM, para inactivar proteasas) mediante dos ciclos de 45 Hz 4 minutos, en el *TissueLyser LT* (Qiagen) incubando 15 minutos en hielo entre ambos ciclos y al finalizar el segundo ciclo de homogenado. Por último, se centrifugó durante 30 minutos a velocidad máxima, en condiciones de refrigeración. Transcurrido el tiempo de centrifuga, se recoge el sobrenadante en un tubo limpio.

3.3.5.3 Cuantificación de proteína total. Método del ácido bicinconínico (BCA).

Para poder estimar la cantidad de proteína que tiene cada uno de los lisados, se utilizó el Kit *Pierce™ BCA Protein Assay Kit - Thermo Fisher Scientific*. Paralelamente se analizaron distintas concentraciones de un estándar de albúmina 2 mg/ml para realizar la recta de calibrado, y se incluyó un blanco (*RIPA buffer*). Todo ello se analizó por duplicado.

Se pipetearon en una placa de 96 pocillos, 25 µl de una dilución 1/5 en el caso del aislamiento de proteína total y otros 25 µl de una dilución 1/2 para la determinación de las proteínas de membrana, 25 µl de distintas concentraciones de estándar y 25 µl control. Y se añadió a cada uno de los pocillos 200 µl de una mezcla de reactivos A y B en proporción (50:1). Posteriormente se incubó durante 30 minutos a 37°C, permitiendo que se desarrollara un producto coloreado de intensidad directamente proporcional a la cantidad de proteína que contenía el pocillo. Se determinó la absorbancia mediante espectrofotometría, en el lector de placas *SPECTROstar Nano BMG LABTECH*, a una longitud de onda de 562 nm.

Con el fin de hacer reaccionar de manera específica las proteínas del lisado, es necesario mantener la proteína desplegada y soluble, esto se consigue gracias a la combinación de la proteína con el cobre en medio básico y su posterior reacción con el ácido bicinconínico que genera ese compuesto coloreado que es proporcional a la cantidad de proteína, y que absorbe luz a 562nm. El reactivo A (carbonato sódico, bicarbonato sódico, ácido bicinconínico y tartrato sódico en una solución 0,1 M de hidróxido sódico) y reactivo B (ácido cúprico al 4%) proporciona las condiciones necesarias para que esta reacción se produzca.

3.3.5.4 Western-blot.

Para poder determinar la cantidad de proteína específica en la muestra es necesario realizar una separación de las proteínas, que se consigue gracias a un proceso de electroforesis en gel de poliacrilamida, y su posterior transferencia a una membrana. Sobre la membrana bloqueada se produce la inmunodetección mediante la utilización de anticuerpos específicos y posteriormente se revelará por quimioluminiscencia. La señal obtenida es densitometría y este resultado será analizado.

Electroforesis en SDS-PAGE.

Para llevar a cabo la separación de las proteínas en base a su tamaño es necesario realizar la preparación previa de la muestra mezclando un volumen de homogenado con un volumen de *Laemmly* 2x (SDS 2%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5%, tampón Tris-HCl 62,5 mM. Bromofenol azul <0.01%, pH 6.8). La mezcla se calentó durante 5 minutos a 96°C, para conseguir que las proteínas se desnaturalicen y se mantengan desplegadas y solubles.

Posteriormente, tras enfriar la muestra se carga el volumen correspondiente a 40 µg de proteína en un gel de SDS PAGE preparados con una concentración del 10% de gel separador y de 4,5% de gel concentrador. Además, se carga en el primer pocillo 5 µl el marcador de peso molecular (*Protein Marker VI (10-245) prestained (A8889,0500) Panreac/Applichem*). Se lleva a cabo la electroforesis a 25mA durante 50 minutos, en un tampón de electroforesis (Tris-HCl 0.25M, Glicina 1.92M, SDS 1%).

Transferencia.

La transferencia de las proteínas separadas mediante electroforesis a la membrana de PVDF (Transfer Membrane (RPN 303F, GE Healthcare)) se realizó durante 45 minutos a 250 mA, en un tampón de transferencia (Tris-HCl 0.25 M, Glicina 0.192 M, SDS 0.2%) en condiciones de refrigeración. Posteriormente se bloqueó la membrana con leche en polvo desnatada al 10% en TBST (Tris-HCl 10mM, NaCl 0.15 M, Tween 0.05% pH 8) durante 30 minutos a temperatura ambiente.

Inmunodetección.

Una vez bloqueada la membrana, se incubó con el anticuerpo primario específico en cada proteína diluido como se muestra en **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, en albúmina sérica bovina (BSA) 5% diluido en TBST con acida sódica al 0.05%. La incubación se realizó a 4°C durante la noche. Para eliminar el excedente y las uniones inespecíficas del anticuerpo primario que pudieran haberse producido durante la incubación, se lava la membrana en tres ocasiones con TBST durante 10 minutos en agitación.

Con el fin de identificar la unión del anticuerpo primario a la proteína, se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario adecuado diluido en leche desnatada en polvo reconstituida al 10% en TBST, como se especifica en la **Tabla 7**. Para eliminar el fondo que se pueda generar por la unión inespecífica del anticuerpo secundario, se lava la membrana 3 veces, durante 10 minutos cada lavado, con TBST. Por último, la proteína se visualiza mediante quimioluminiscencia con el kit comercial ECL (GE Healthcare, Inglaterra) en el transiluminador *ChemiDoc XRS+* (Bio-Rad). Las bandas obtenidas, tras el revelado, se densitometraron utilizando el programa informático Image J 1.48V (NIH, EE.UU.).

Cuantificación relativa del nivel de proteína en placenta.

Los valores obtenidos tras el densitometrado de las muestras en las distintas membranas fueron corregidos frente a un control interno y se normalizaron frente a la β-actina.

3.4 Análisis estadístico.

A continuación, se describen los procedimientos estadísticos que se han aplicado en cada uno de los estudios, a los que se hará referencia en las diferentes figuras de la tesis.

Tabla 7. Listado de anticuerpos.

Anticuerpo	Proteína diana (casa comercial, referencia)	Especie	Dilución
Primario	LIPINA (Abcam, ab176347)	Conejo	1:2.000
Primario	GLUT 1 (Affinity, AF0173)	Conejo	1:500
Primario	CBS (Abcam, ab135626)	Conejo	1:5.000
Primario	PI3K (Merck/Millipore, 12-348)	Conejo	1:5.000
Primario	β -Actina (Sigma-Aldrich, A5316)	Ratón	1:5.000
Secundario	Anti-conejo IgG unido a peroxidasa (A9044)	Conejo	1:10.000
Secundario	Anti-ratón IgG unido a peroxidasa (A0545)	Cabra	1:10.000

De izquierda a derecha se muestra, el tipo de anticuerpo, la proteína que reconoce el anticuerpo y su referencia comercial, la especie en la que se generó el anticuerpo y la dilución a la que se prepara.

3.4.1 Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de genotipado.

Para el análisis de los resultados obtenidos en el estudio de genotipado se utilizaron los programas informáticos *IBM SPSS statistics* (versión 27) y *GraphPad PRISM* (versión 9). Para el análisis de los parámetros clínicos de las cohortes, en primer lugar, se estudió la normalidad de la distribución de los datos por grupo, mediante la prueba de *Kolmogórov-Smirnov* y *Shapiro Wilk*. En base a estos resultados se aplicaron las pruebas correspondientes, *t-Student*, en la comparación de medias de grupos que presentaban unos valores con distribución normal, y *U de Mann-Whitney* en aquellos grupos que no presentan distribución normal.

Por otro lado, se calculó la frecuencia alélica de los polimorfismos en las distintas cohortes de estudio. Se determinó el riesgo mediante la determinación del *Odds Ratio* y del intervalo de confianza al 95%. Las diferencias que presenta la frecuencia del alelo de riesgo entre los grupos se analizaron mediante un test de Chi-cuadrado. Los resultados obtenidos se consideraron estadísticamente significativos si presentan un *p-valor* inferior o igual a 0.05.

3.4.2 Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de secuenciación de miRNAs.

En el análisis estadístico se utilizó la media recortada del método de normalización de los valores M (normalización TMM) ([Robinson & Oshlack, 2010](#)). La normalización TMM compensa los efectos específicos de la muestra causados por la variación en el tamaño de la librería /profundidad de secuencia entre muestras. Además, la normalización de TMM compensa los posibles efectos de submuestreo y sobremuestreo. De esta manera también se evita que la expresión diferencial de genes de la población de miRNA de las muestras de como resultado librerías con sesgos cuando unos pocos miRNAs altamente expresados dominan el conjunto de lectura en un tipo de muestra y no en el otro. Tras este análisis, se

seleccionaron los miRNAs que se detectaban en todas las muestras, y de todos ellos se seleccionaron los 50 miRNA con el mejor coeficiente de variación (% CV) para el análisis. Además, se realizaron diagramas de tipo *Heat-map* para visualizar el agrupamiento jerárquico bidireccional de genes y muestras.

El análisis de expresión diferencial se realizó utilizando TMM en el paquete de software estadístico EdgeR (Bioconductor, <http://www.bioconductor.org/>). Con ello se investiga el cambio relativo (es decir, recuentos) entre diferentes muestras y con la normalización de TMM, las pruebas estadísticas estarán menos sesgadas y se reducirá la tasa de falsos positivos. Para cada comparación de expresión diferencial, TMM se calcula en función del subconjunto de características y el subconjunto de muestras analizadas. El paso de análisis de expresión diferencial intenta distinguir la variación biológica de la variación técnica dentro del experimento, suponiendo que esto varía entre los miRNA. Los *p-valores* de miRNAs que se expresan significativamente de manera diferencial, se estiman mediante una prueba exacta suponiendo una distribución binomial negativa. Los resultados obtenidos mostraban la expresión diferencial entre los grupos para cada miRNA, representada mediante el logFC, el *p-valor*, así como los valores promedio de TMM por grupo.

Para la selección de los miRNA candidatos a la validación por RT-qPCR nos basamos en los siguientes criterios: en primer lugar, resultaban de interés aquellos miRNA que presentaban un *p-valor* <0,05, ya que mostraba diferencias en el nivel del miRNA entre los distintos grupos de estudio. De todos aquellos miRNA que presentaban un *p-valor* <0,05 se escogieron aquellos cuyo *Fold Change* era más alto, lo que garantizaba una mayor probabilidad de validación. Además, era interesante que el número de lecturas (TMM) para dichos miRNA estuviera por encima de 10-15, asegurando que se encontraran por encima del límite de detección del equipo escogido para la validación por RT-qPCR.

3.4.3 Análisis estadístico de los resultados de cuantificación de miRNA tras la validación, y de los mRNA y proteínas en placenta de tercer trimestre.

Para el análisis de los resultados de los niveles de miRNA en plasma y de los niveles de expresión de mRNA en placenta humana de tercer trimestre se utilizaron los datos obtenidos por el método *Livak*. Los datos utilizados para el análisis estadístico en la determinación de los niveles de proteína por *Western-blot*, fueron los obtenidos tras la normalización del densitometrado de la muestra frente al control interno y al control de carga con β -actina.

El análisis estadístico se basó en la comparación de medias cuando se cumplieron las condiciones para aplicar test paramétricos y en la comparación de rangos cuando no se cumplieron esas condiciones y hubo que aplicar test no paramétricos. Los paquetes informáticos utilizados para el análisis fueron *IBM SPSS statistics* (versión 27) y *GraphPad PRISM* (versión 9).

En primer lugar, se estudió la normalidad de la distribución de los datos en cada grupo mediante la prueba de *Kolmogórov-Smirnov* y *Shapiro Wilk*. En base a estos resultados se aplicaron las pruebas correspondientes, *t-Student*, en la comparación de medias de dos grupos que presentaban unos valores con distribución normal y *U de Mann-Whitney* en aquellos grupos que no presentaban una distribución normal. Para la comparación entre la cara materna y la cara fetal, dado que se trata de la misma placenta, se aplicó una prueba de comparación de medias de muestras pareadas, de manera que, en aquellos grupos en los que los datos presentaban una distribución normal se aplicó un análisis *t-Student* para muestras pareadas, mientras que en los grupos que no presentaban una distribución normal se aplicó una prueba de *Wilcoxon*.

Se utilizó el ANOVA de una vía para el análisis de las medias cuando el estudio constaba de más de dos grupos, como es el caso del análisis de comparación de medias entre el grupo control, el grupo con preeclampsia de aparición temprana y de aparición tardía. Cuando el resultado del ANOVA fue significativo, se aplicó el test *post-hoc* de comparaciones múltiples por pares de Dunnett. En caso de que los datos no sigan una distribución normal o el tamaño muestral sea demasiado pequeño, la prueba escogida fue *Kruskal-Wallis*. En este caso, el test *post-hoc* de comparaciones múltiples que se usó fue el de Dunn. Para analizar la influencia de dos factores en el estudio de expresión se utilizó un ANOVA de doble vía. Los datos obtenidos se consideraron estadísticamente significativos si presentan un *p-valor* inferior o igual a 0.05.

La relación que existe entre los parámetros estudiados se realizó mediante un estudio de correlación utilizando la *Rho de Spearman*. Los datos obtenidos se consideraron estadísticamente significativos si presentan un *p-valor* inferior o igual a 0.05.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 OBJETIVO 1: Resultados y discusión

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental transversal de casos y controles realizado en mujeres embarazadas del Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital Universitario La Paz de Madrid bajo la supervisión del Dr. J.L. Bartha. Los sujetos de estudio son mujeres embarazadas con diagnóstico de diabetes gestacional y embarazadas sanas como grupo control (**Figura 8**). Participan en el estudio un total de 66 mujeres de las cuales 14 desarrollaron diabetes gestacional en el primer trimestre de gestación, 16 desarrollaron diabetes gestacional en el segundo trimestre de gestación y 36 mujeres que presentaron una gestación no patológica que constituyen el grupo control. La diabetes gestacional (DG) se diagnosticó según la estrategia de dos pasos mediante el test de cribado con 50 g de glucosa y, en caso de positividad (glucemia > 140 mg/dL), con la realización de una segunda sobrecarga oral con 100 g de glucosa. Se llevó a cabo una determinación basal de la glucemia, así como otras determinaciones sucesivas, transcurridas 1, 2 y 3 horas según las recomendaciones del Grupo Español de Diabetes y Embarazo.

Los criterios de inclusión que se utilizaron para el reclutamiento de las mujeres fueron la edad mayor o igual a 16 años y la firma del consentimiento informado. Los criterios de exclusión aplicados en ambos grupos fueron la edad gestacional por encima de la semana 14, la edad materna menor de 16 años, anomalía fetal conocida, embarazo múltiple y diabetes mellitus pregestacional.

La recogida de datos clínicos de las gestantes se realizó al ingreso y tras el parto, donde se recogió la edad, los antecedentes obstétricos, antecedentes personales y ginecológicos, el peso, la talla, el índice de masa corporal, la edad gestacional al diagnóstico de diabetes gestacional, la edad gestacional en el momento del parto, una bioquímica básica, proteinuria, medicación, aparición de complicaciones, estudio del crecimiento fetal, vía del parto, peso del recién nacido, sexo, diagnóstico al alta de recién nacido y de la madre. Todos estos análisis se realizaron en el Hospital Universitario La Paz de Madrid.

Como hemos comentado cada participante en el estudio debe haber firmado un documento de consentimiento informado para poder ser incluida en el estudio. Todos los datos están protegidos de acuerdo con las leyes de Protección de Datos Europea y la Ley Española de Protección de Datos (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre y Ley Orgánica 7/2021, de 26 de mayo).

Toma de muestra.

Para el estudio de genotipado y la determinación de los niveles de miRNA, se recogieron las muestras de sangre de las gestantes, con y sin diabetes gestacional, en el primer trimestre de la gestación. Estas muestras fueron recogidas con EDTA. La sangre total, destinada al estudio de genotipado, se almacenó inmediatamente a - 80°C. Las muestras destinadas a la determinación de los niveles de miRNA

fueron centrifugadas y posteriormente el plasma fue alicuotado y almacenado a -80°C . Todas las muestras se conservaron en el biobanco del Hospital Universitario La Paz, en Madrid, hasta el momento de su procesamiento. Los parámetros bioquímicos en la sangre de las gestantes fueron analizados por el departamento de análisis clínicos del Hospital Universitario La Paz.

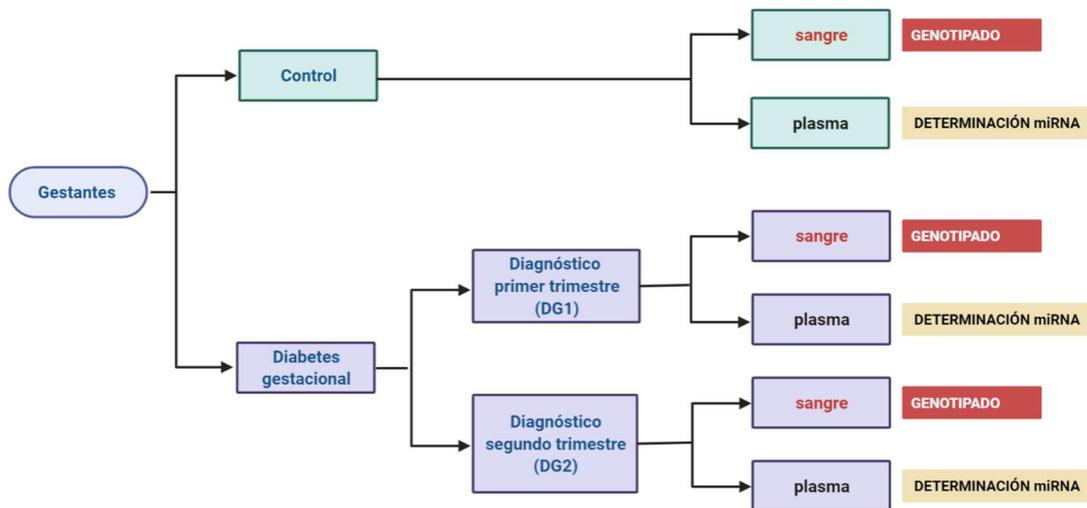


Figura 8. Esquema del diseño experimental del estudio de biomarcadores diagnósticos en diabetes gestacional.

4.1.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LAS GESTANTES.

Los datos clínicos (Tabla 8 y Figura 9) de las pacientes y los recién nacidos recogidos para el estudio muestran como las gestantes con diabetes gestacional tienen mayores niveles de glucosa. Esta es una situación lógica dado que el diagnóstico se realiza en base a este criterio. Por otra parte, observamos como además las gestantes con diabetes gestacional tienen mayor edad que las gestantes control y, en el caso de las gestantes con diabetes gestacional de diagnóstico en primer trimestre, presentan también un mayor índice de masa corporal. Sin embargo, no encontramos diferencias en la ganancia de peso materna durante la gestación en el grupo control y el grupo de mujeres con DG. La edad gestacional en el caso de las gestantes con diabetes es significativamente menor que en las gestantes control. En lo que respecta al peso del recién nacido, en nuestro estudio encontramos que los recién nacidos de gestaciones complicadas con DG presentan menor peso al nacer en relación con el grupo control, lo contrario a lo que cabría esperar (Tabrizi et al., 2019). Este menor peso del recién nacido en las madres con DG podría deberse, por una parte, a la diferencia en la edad gestacional, ya que fue significativamente menor en este grupo, o bien a que la intervención terapéutica en estas mujeres haya permitido un mejor control de la glucemia y por tanto haber prevenido la aparición de macrosomía.

Tabla 8. Características clínicas materna, fetales y obstétricas de gestaciones control y con diabetes gestacional

Parámetros clínicos (unidades)	Control (N=36)	DG (N=30)	DG1 (N=14)	DG2 (N=16)
Glucosa basal (mg/dL)	73,47 ± 8,68	90,10 ± 13,49	91,76 ± 16,45	88,07 ± 8,90
Glucosa 1h (mg/dL)	112,35 ± 27,63	175,16 ± 31,06	181,94 ± 35,96	166,93 ± 22,40
Edad materna (años)	32,26 ± 5,67	37,93 ± 4,12	38,77 ± 4,55	36,84 ± 3,35
IMCi (Kg/m ²)	24,54 ± 6,50	26,87 ± 7,02	29,12 ± 6,00	24,46 ± 7,44
Ganancia de peso (Kg)	12,15 ± 4,33	13,00 ± 14,40	16,48 ± 20,26	9,78 ± 3,93
Edad gestacional (semanas)	39,70 ± 1,60	38,27 ± 2,13	38,55 ± 1,73	37,89 ± 2,60
Peso recién nacido (g)	3421,74 ± 440,32	2945,20 ± 720,66	3100,35 ± 803,87	2742,31 ± 561,07

En la tabla se representan los datos clínicos de las mujeres que participaron en el estudio, así como los datos fetales y obstétricos. Los resultados se muestran como media y desviación estándar. Se ha clasificado la cohorte como mujeres control (normoglucémicas) y mujeres con diabetes gestacional (DG). Este último grupo fue subclassificado en función del momento del diagnóstico de la diabetes, bien en primer trimestre (DG1) o bien en el segundo trimestre (DG2) de la gestación.

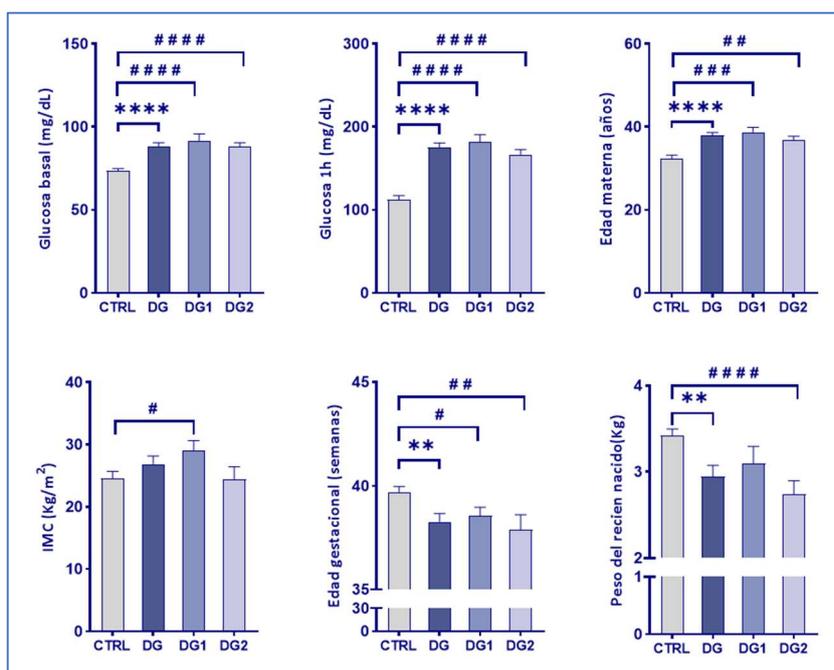


Figura 9. Análisis de los datos clínicos de las gestantes control y gestantes con diabetes gestacional. En las gráficas se representa la media y el error estándar de la media. El análisis se realizó mediante el test de *U de Mann Whitney*. Los resultados * $p < 0.05$ indica que existen diferencias estadísticamente significativas de las gestantes control (CTRL) frente a las gestantes con diabetes gestacional (DG); # $p < 0.05$ indican diferencias estadísticamente significativas de control versus diabetes diagnosticada en primer trimestre (DG1) o en segundo trimestre (DG2).

4.1.2 ESTUDIO DE GENOTIPADO EN GESTANTES CON Y SIN DIABETES GESTACIONAL.

Numerosos estudios han abordado la relación entre ciertos polimorfismos y la diabetes gestacional, intentando identificar posibles biomarcadores diagnósticos o pronósticos de la patología. En la mayoría de los casos se ha tratado de relacionar polimorfismos que previamente se habían descrito en patologías similares como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), aunque sin éxito. Uno de los problemas en el

diagnóstico correcto de la diabetes gestacional es precisamente poder diferenciar una DM2 previa de la diabetes gestacional (DG) ([American Diabetes Association, 2021a](#)), por lo que es importante encontrar biomarcadores diagnósticos que aseguren la correcta clasificación de la patología. Con el fin de identificar SNPs (*single nucleotide polymorphism*) como potenciales biomarcadores, realizamos el análisis de genotipado, que se llevó a cabo en las muestras de sangre de las gestantes, con especial atención a la diabetes de desarrollo temprano.

Por ello, en primer lugar, se analizaron los resultados comparando las gestaciones control con todas las gestaciones complicadas con diabetes gestacional y en un segundo abordaje se separaron las mujeres con diabetes gestacional en función de si era de diagnóstico temprano o tardío.

4.1.2.1 Genotipado de gestantes con diabetes gestacional y gestantes control.

Los polimorfismos identificados cuando se compararon los resultados obtenidos agrupando a todas las mujeres con diabetes gestacional, se muestran en la **Tabla 9**. En este estudio encontramos 6 SNPs en los cuales la frecuencia del alelo de riesgo en el grupo de las gestantes con diabetes es significativamente mayor que en el grupo control. Dichos polimorfismos se sitúan en los siguientes genes:

- El gen *RREB1* (del inglés *Ras Responsive Element Binding Protein 1*)
- El gen *GLIS3* (del inglés *GLIS family zinc finger 3*)
- El gen *MTNR1B* (receptor de melatonina 1B)
- El gen *GPSM1* (del inglés *G protein signaling modulator 1*)
- El gen *IGF2BP2* (del inglés *insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2*)

En la **Tabla 9** se describen, para estos polimorfismos, el alelo de riesgo, la frecuencia alélica calculada en la cohorte de estudio y el riesgo que este alelo supone calculado mediante la Odds Ratio y el intervalo de confianza al 95%.

Es de destacar el gen del receptor de melatonina 1B, del que se obtuvieron dos polimorfismos, el rs1387153 y el rs1083096, con mayor frecuencia de alelo de riesgo en las diabéticas.

El gen *MTNR1B* codifica para una de las dos formas de alta afinidad del receptor de melatonina, que en humanos se localiza en el cromosoma 11q21-22. Además de en la placenta, el gen *MTNR1B* se expresa en las células beta pancreáticas y se ha relacionado con la secreción de insulina y con el deterioro de estas células ([Y. Zhang, Sun, Hu, & Zhao, 2014](#)). Por su parte, la melatonina es una hormona secretada por la glándula pineal además de otros tejidos. Actúa a través de receptores de membrana acoplados a proteína G, aunque también es capaz de atravesar la membrana celular. Esta hormona participa en la regulación en numerosos procesos fisiológicos, además se le han atribuido efectos antiinflamatorios y antioxidantes entre otros ([Kvetnoy et al., 2022](#)).

Tabla 9. Estudio de genotipado. Comparación control versus diabetes gestacional (DG)

Gen	SNP	Alelo riesgo	Alelo no riesgo	RAF Control	RAF DG	Odds Ratio	IC (95%)	p-valor
<i>RREB1</i>	rs9379084	A	G	0,14	0,30	2,657	1,117 - 6,321	0,0242
<i>GLIS3</i>	rs10814916	A	C	0,60	0,82	3,004	1,342 - 6,725	0,0063
<i>MTNR1B</i>	rs1387153	T	C	0,25	0,52	3,207	1,537 - 6,691	0,0016
<i>GPSM1</i>	rs11787792	G	A	0,50	0,80	4,000	1,828 - 8,755	0,0004
<i>IGF2BP2</i>	rs4402960	T	G	0,21	0,48	3,555	1,660 - 7,613	0,0008
<i>MTNR1B</i>	rs10830963	G	C	0,19	0,55	5,063	2,335 - 10,98	<0,0001

En la tabla se describe de izquierda a derecha el nombre del gen, el código del SNP, el alelo de riesgo y no riesgo para ese polimorfismo, la frecuencia del alelo de riesgo (RAF), el valor calculado de la Odds Ratio, el intervalo de confianza del 95% y el *p-valor*. Las diferencias en la frecuencia alélica calculada para el alelo de riesgo se analizaron mediante un test de Chi-cuadrado. Se consideraron resultados estadísticamente significativos si el *p-valor* es <0.05.

Para una vista más gráfica de los resultados, se representan en diversos diagramas (**Figura 10**) que incluyen la frecuencia del alelo de riesgo de cada uno de los polimorfismos. Como se puede observar, para todos los polimorfismos el alelo de riesgo presentó una frecuencia alélica significativamente mayor en el grupo de las mujeres con diabetes gestacional, lo que sugiere que dichos polimorfismos podrían ir asociados a un mayor riesgo de enfermedad.

Como se ha comentado anteriormente, la diabetes gestacional, posee rasgos fisiopatológicos en común con la DM2. Numerosos estudios han mostrado asociaciones entre variaciones genéticas y el riesgo de desarrollar DM2. Precisamente alguno de estos polimorfismos se ha estudiado también en relación con la DG. Una de las asociaciones más significativas encontradas hasta la fecha es la relación, comentada anteriormente, de los polimorfismos en el receptor de melatonina 1B y la diabetes tipo 2 ([Popova et al., 2021](#)). En nuestro caso la presencia del alelo T en el polimorfismo rs1387153 y G en el rs10830963 precisamente es significativamente más alta en el grupo de gestantes con diabetes gestacional.

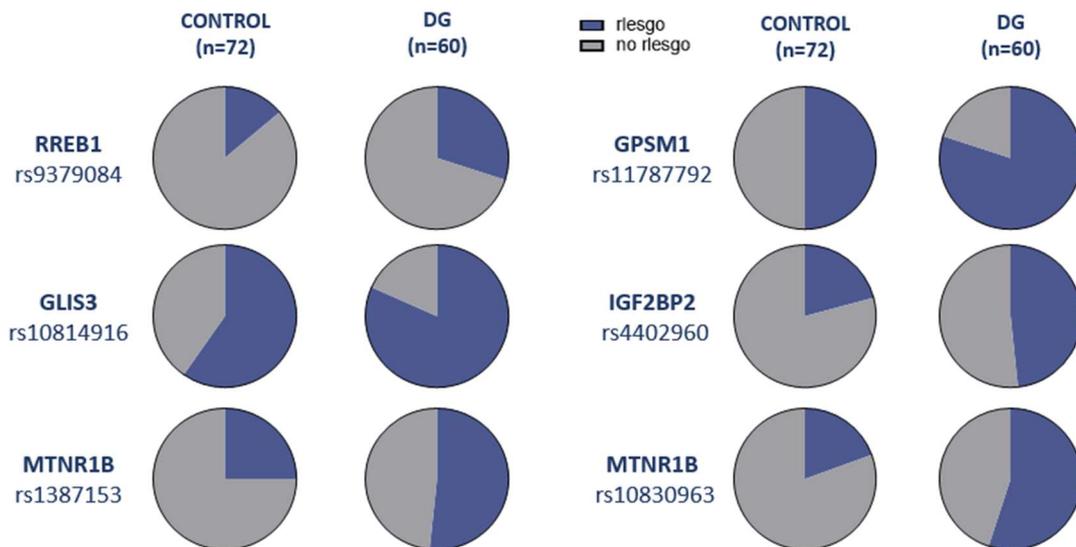


Figura 10. Representación gráfica de frecuencia alélica. En la figura se muestran los resultados de frecuencia alélica obtenidos, en el grupo control y el grupo de gestantes con diabetes gestacional, de aquellos genes en los que se observa una diferencia entre los grupos. El alelo de riesgo se representa en color azul, mientras que el alelo de no riesgo se representa en color gris. N, representa el número de alelos analizados.

En nuestro estudio hemos encontrado también que la presencia del alelo G en el polimorfismo rs10830963 del gen *MTNR1B*, supone un riesgo 5,063 veces mayor de desarrollar diabetes gestacional en la mujer. Precisamente, se ha descrito que la variante rs10830963 se asocia con un aumento en la expresión del receptor en los islotes pancreáticos (Alharbi et al., 2019). La mayoría de los estudios realizados en los últimos años, en los que se ha relacionado el polimorfismo rs10830963 del gen *MTNR1B* con la diabetes gestacional, se han llevado a cabo en población china, aunque también se ha descrito esta variante en población de arabia saudí (Alharbi et al., 2019) y en población caucásica (Stuebe et al., 2014) (van Poppel et al., 2022). Este polimorfismo también se ha relacionado con la respuesta al tratamiento de intervención del estilo de vida en gestantes con diabetes gestacional. En dicho estudio se ha descrito que aquellas gestantes con DG que presentaban el alelo de riesgo mostraban peores resultados frente a el tratamiento respecto a aquellas gestantes con DG que no presentaban el alelo de riesgo (Grotenfelt et al., 2016).

Aunque a lo largo de los años se ha mostrado una fuerte asociación del polimorfismo anteriormente mencionado en el gen *MTNR1B* con la aparición de diabetes gestacional, también se han estudiado otras variantes del mismo gen que podrían tener también cierta asociación con el desarrollo de la patología. Precisamente en nuestro estudio hemos encontrado que el alelo T del polimorfismo rs1387153 del gen *MTNR1B* puede suponer un riesgo 3,207 veces superior de desarrollar diabetes gestacional. Esta relación se ha descrito también en estudios previos en población china (Q. Liu et al., 2016) y en población de arabia saudí (Alharbi et al., 2019). Bajo nuestro conocimiento, el presente estudio es el primero en el que se ha asociado en población caucásica esta variante y el riesgo a desarrollar diabetes gestacional.

Por otro lado, en el gen *IGF2BP2* (del inglés *insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 2*), que se encuentra en el cromosoma 3q27, se han asociado algunos polimorfismos con una reducción en la función de las células beta pancreáticas y un riesgo al desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 ([J. Liu, Song, Zhao, & Meng, 2020](#)). Además, también se ha asociado con la diabetes gestacional, ya que existen estudios en los que se ha encontrado relación entre la presencia del alelo de riesgo y la patología en población coreana ([Cho et al., 2009](#)) o china ([Y. Wang et al., 2011](#)). En nuestro estudio hemos encontrado una mayor presencia del alelo de riesgo para el polimorfismo rs4402960 en la cohorte de mujeres con diabetes gestacional con un riesgo 3,5 veces mayor que el grupo de gestantes control. Sin embargo, en un metaanálisis reciente no se pudo encontrar asociación entre el polimorfismo y la susceptibilidad al riesgo de desarrollar diabetes gestacional ([J. Liu et al., 2020](#)). Otros estudios han llegado a conclusiones similares, como el realizado por Tarnowski y colaboradores en 2019 en población caucásica, en el cual tampoco se encontró asociación entre la presencia del alelo de riesgo y la diabetes gestacional ([Tarnowski et al., 2019](#)). En nuestro conocimiento, el presente trabajo es el primer estudio en el que se ha encontrado una asociación del SNP rs4402960 del *IGF2BP2* y la diabetes gestacional en población caucásica, ya que las gestantes con la enfermedad presentan una mayor prevalencia del alelo T en citado polimorfismo.

El gen *GPSM1* es un gen que codifica para un modulador de proteínas G denominado "*G protein signaling modulator 1*". Este gen se encuentra ubicado en el cromosoma 9q34.3 y la proteína por la que codifica modula la actividad basal de los sistemas de señalización de las proteínas G. No se han encontrado muchos estudios en los que se analice la relación entre el polimorfismo rs11787792 del gen *GPSM1* y la diabetes gestacional. Únicamente hemos encontrado un estudio en el que la relación observada se produce entre el polimorfismo y la DM2 ([Hara et al., 2014](#)) pero no se encuentra esta asociación en las mujeres con diabetes gestacional ([M. Ding et al., 2018](#)). Sin embargo, en nuestro estudio si hemos observado como existe una mayor frecuencia del alelo de riesgo para este polimorfismo en el grupo de mujeres con diabetes gestacional.

El gen *GLIS3* (del inglés *GLIS family zinc finger 3*) codifica para una proteína con dedos de zinc que actúa como factor de transcripción. Esta proteína se expresa en el páncreas y participa en el desarrollo de las células β y en la expresión de insulina. Se han relacionado mutaciones en este gen con el desarrollo de diabetes mellitus neonatal ([London et al., 2021](#)). Además, este factor de transcripción participa en varios procesos relevantes en la gestación, como el desarrollo embrionario, la proliferación y la diferenciación celular. *GLIS3* es un factor importante en la biosíntesis de hormonas y el desarrollo de tiroides, por lo que las mutaciones en este gen se han asociado con diversas anomalías tiroideas, como el hipotiroidismo y la diabetes ([Scoville, Kang, & Jetten, 2020](#)). El polimorfismo rs10814916 de este gen se ha relacionado en estudios previos con el desarrollo de diabetes tipo 2 y se ha visto que puede estar también implicado del mismo modo, en el desarrollo de diabetes gestacional ([M. Ding et al., 2018](#)). De forma similar, en nuestro

estudio hemos observado como las mujeres de la cohorte de diabetes gestacional presentan una mayor frecuencia del alelo de riesgo para esta variante, sin haber diferencias entre las que desarrollaron la diabetes en el primer o en el segundo trimestre. Sin embargo, en el presente trabajo no hemos encontrado una asociación entre los otros dos polimorfismos estudiados en este gen (**Tabla 9**), rs7025929 y rs7041847 y una mayor susceptibilidad al desarrollo de diabetes gestacional, dado que no hay diferencias en la distribución alélica entre los grupos de mujeres gestantes.

El gen *RREB1* (del inglés *Ras Responsive Element Binding Protein 1*) codifica para la proteína RREB1, un factor de transcripción con dedos de zinc que modula la activación transcripcional en respuesta a la calcitonina. La interacción de la calcitonina con su receptor desencadena una cascada de señalización mediada por la proteína Ras, que genera la activación de la transcripción de genes por la unión de RREB1 a la región promotora. Esta proteína parece estar involucrada en procesos de reparación del daño en el DNA, crecimiento, diferenciación y proliferación celular, entre otros, además de intervenir también en procesos de regulación de la homeostasis de la glucosa. Es por ello que el desequilibrio en la función de RREB1 se ha relacionado con el desarrollo de distintas patologías entre ellas la DM2 y procesos neoplásicos. Concretamente, la variante rs9379084 del gen se ha relacionado con la susceptibilidad al desarrollo de DM2 ([Deng, Xia, Zhang, Ejaz, & Liang, 2020](#)). En el estudio de Bonomo y colaboradores en 2014, se describió la asociación de dos polimorfismos en el gen *RREB1*, rs9379084 y rs41302867, asociados con la protección frente a la enfermedad renal en individuos afroamericanos y europeos con DM2 ([Bonomo et al., 2014](#)). En nuestro estudio hemos encontrado que la variante rs9379084 del gen *RREB1* supone un aumento del riesgo a desarrollar diabetes gestacional que es 2,6 veces superior en las mujeres portadoras del alelo A. Un estudio realizado en población rusa, en 2018, mostró la asociación entre en alelo A de la variante rs9379084 y el desarrollo de DM2, coincidiendo con nuestros resultados ([Barbitoff et al., 2018](#)).

En nuestro estudio, además, incluimos el análisis de otras variantes del gen *RREB1* (**Tabla 9**), rs2714315 y rs12192672, pese a que no se han descrito previamente en la bibliografía en relación con diabetes gestacional u otras patologías relacionadas. Los resultados obtenidos en el análisis muestran que estas variantes no parecen estar asociadas con el desarrollo de diabetes gestacional, ya que no hemos encontrado diferencias en la frecuencia alélica entre los grupos de estudio.

De todos los polimorfismos identificados, se eliminaron aquellos que presentaban una prevalencia menor del 1%. Aunque en nuestro estudio, además de los SNPs mencionados anteriormente, se incluyeron otros que se habían asociado en la bibliografía con DM2 o con diabetes gestacional, nosotros no hemos encontrado una asociación significativa entre estos SNPs y la enfermedad. Tal es el caso del gen *SLC30A8*. En la bibliografía se ha descrito como variantes de este gen podrían proteger frente al desarrollo de DM2, ([Gerber & Rutter, 2017](#)), en otros casos los resultados publicados en la bibliografía describen la

asociación entre el polimorfismo rs13266634 de *SCLC30A8* y un mayor riesgo de diabetes gestacional en población caucásica, asiática ([Lin, Wang, Zhang, & Jin, 2018](#)) y coreana ([Abassi et al., 2020](#)), aunque en población eurobrasileña no se ha encontrado esta asociación ([Teleginski et al., 2017](#)). Otras variantes del gen *SCLC30A8* como rs2466293 parece que si se han relacionado con el desarrollo de diabetes gestacional en población china ([X. Wang et al., 2017](#)). Sin embargo, las variantes del gen *SCLC30A8* incluidas en nuestro estudio no han mostrado diferencias en cuanto a la frecuencia alélica entre el grupo control y el grupo de gestantes con diabetes gestacional.

El gen *CDKAL1* (del inglés *CDK5 regulatory subunit associated protein 1 like 1*) es un gen que codifica la proteína similar a 1 asociada a la subunidad reguladora de quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5). Este gen se expresa fundamentalmente en las células de los islotes pancreáticos. Se cree que las variantes de este gen pueden influir en la expresión de *CDKAL1* alterando la secreción de insulina y contribuyendo al deterioro de las células β pancreáticas. También se ha descrito la susceptibilidad a la diabetes gestacional a consecuencia del polimorfismo rs7754840 en el gen *CDKAL1* en trabajos realizados en población india ([Kanthimathi et al., 2015](#)) y coreana ([Cho et al., 2009](#)), o en un metaanálisis realizado en 2021 ([X. Y. Yu, Song, Wei, Wen, & Liu, 2021](#)). Sin embargo, en línea con los hallazgos encontrados en el presente trabajo, un estudio realizado en población egipcia no encontró asociación entre del polimorfismo rs7754840 en el gen *CDKAL1* y la diabetes gestacional ([Noury et al., 2018](#)).

El polimorfismo rs1801278 del gen del sustrato del receptor de insulina 1 (*IRS1*) se ha relacionado con la diabetes gestacional en diversos estudios realizados, la mayor parte de ellos en población asiática. En algunos de ellos se ha descrito un efecto protector del genotipo A en relación con la diabetes gestacional ([L. Wu, Fang, Zhang, Ye, & Zhao, 2021](#)) y en otros una mayor susceptibilidad a enfermedad ([L. Wu, Cui, Tam, Ma, & Wang, 2016](#); [Y. Zhang et al., 2014](#)). Dada la ausencia de asociación en nuestro estudio, parece que en la población caucásica la presencia del alelo de riesgo en este polimorfismo se distribuye de igual modo en la población con diabetes gestacional y en la población normal.

En lo que respecta al gen del factor de transcripción 7 (*TCF7L2*) son numerosos los artículos que se han publicado en relación con las posibles variaciones en este gen y la diabetes gestacional, incluyéndose en la mayoría de los metaanálisis publicados hasta la fecha. Sin embargo, en nuestro estudio los polimorfismos analizados en este gen no se han asociado con un mayor riesgo al desarrollo de diabetes gestacional. Entre otros, el polimorfismo rs7903146 ha sido ampliamente estudiado y se han encontrado resultados controvertidos respecto a esta variante. Así, en un estudio en población caucásica se ha propuesto que existe relación entre dicho polimorfismo y el riesgo al desarrollo de diabetes gestacional ([Franzago et al., 2017](#)), mientras que en otros, se afirma la relación el polimorfismo y diabetes gestacional pero en la población asiática ([L. Wu et al., 2016](#)) y no en la caucásica ([Klein et al., 2012](#)).

Además, en un estudio realizado en Suecia se ha sugerido que el polimorfismo rs7903146 podría asociarse a una mayor probabilidad de desarrollar DM2 post parto ([Ekelund et al., 2012](#)). Por último, el polimorfismo rs12255372, en el que tampoco hemos encontrado asociación en nuestro estudio, también presenta resultados contradictorios en trabajos anteriores, ya que se ha asociado al mayor riesgo de diabetes gestacional en población caucásica ([Klein et al., 2012](#)) pero no en brasileña ([Aydemir et al., 2016](#); [de Melo et al., 2015](#)).

La ausencia de asociación de la diabetes gestacional con diversos polimorfismos que hemos encontrado en nuestro estudio va en línea con datos previos en otras poblaciones. Tal es el caso del polimorfismo rs4994 del receptor β 3-adrenérgico que se ha estudiado en población taiwanesa ([P. J. Tsai et al., 2004](#)) y en población caucásica ([Fallucca et al., 2006](#)) sin observarse ninguna asociación con diabetes gestacional. Resultados similares se han publicado en relación con el polimorfismo rs1799884 del gen de la glucoquinasa (*GCK*), como se muestra en un estudio realizado en Polonia ([Tarnowski et al., 2017](#)). Con respecto al polimorfismo rs1801282 del receptor activado por el proliferador de peroxisomas tipo gamma (*PPARG*) existe controversia en cuanto al riesgo que supone en el desarrollo de diabetes gestacional. Parece tener cierta asociación en población asiática ([L. Wu et al., 2016](#)) y sin embargo, no se ha encontrado asociación en población caucásica ([Franzago et al., 2017](#)) o brasileña ([Anghebem-Oliveira et al., 2017](#)).

Parece necesario referir siempre las asociaciones de riesgo a una población determinada, ya que lo que se cumple para una población no se tiene porqué cumplir para otra y no por ello deja de ser de utilidad. Sin embargo, a la vista de estos resultados obtenidos de muy diferentes poblaciones, podría descartarse la contribución de estos polimorfismos (rs4994, rs1799884 y rs1801282) en el desarrollo de diabetes gestacional.

Respecto al momento en el que se desarrolla la diabetes gestacional, es decir, en primer o en segundo trimestre de gestación, sería de gran utilidad identificar biomarcadores que permitan realizar un diagnóstico temprano de la enfermedad. Por ello, también se contrastó si alguno de los polimorfismos asociados a la diabetes gestacional se pudiera asociar específicamente con el desarrollo de diabetes gestacional de aparición en primer trimestre (DG1) o en el segundo trimestre de gestación (DG2). Por ello se separaron las mujeres en función del momento del diagnóstico de la diabetes gestacional y se compararon las frecuencias alélicas con el grupo control. Los resultados obtenidos en el estudio de diabéticas diagnosticadas en primer trimestre se muestran en la **Tabla 10** y su representación gráfica en la **Figura 11**. Los resultados obtenidos en el estudio de diabéticas diagnosticadas en segundo trimestre se muestran en la **Tabla 11** y se representan gráficamente en la **Figura 12**. De todos los SNPs encontrados solo observamos diferencias estadísticamente significativas en el receptor de melatonina y en el gen *KCNJ11*. Estas diferencias se describen a continuación.

4.1.2.2 Los polimorfismos del receptor de melatonina tipo 1B muestran un patrón diferencial entre diabetes diagnosticada en primer trimestre o en segundo trimestre de gestación.

En base a los resultados obtenidos (reflejados en la **Tabla 10**) podemos afirmar que en las gestantes DG1 existe una mayor frecuencia alélica de los alelos de riesgo en los dos polimorfismos del gen de *MTNR1B* (el rs1387153 y el rs1083096), que por el contrario no se presenta en las DG2. Parece por tanto que la diferencia en las mujeres con diabetes gestacional con respecto al grupo control, que se ha descrito en el apartado anterior, se debía a la alta prevalencia de estos polimorfismos en el grupo de mujeres con DG1. Este resultado sugiere que estos dos polimorfismos del receptor de melatonina 1B podrían ser potenciales marcadores de diabetes gestacional de aparición temprana. En este sentido, podría existir un solapamiento dado que este polimorfismo también está asociado con DM2, por lo que podría generar una predicción errónea, si se confunde el diagnóstico de diabetes gestacional en primer trimestre cuando en realidad la mujer tenía una DM2 en desarrollo. Bien es verdad, que parece estar más fuertemente relacionado con un mayor riesgo de diabetes gestacional que de DM2 ([Popova et al., 2021](#)).

Recientemente se ha realizado un estudio en mujeres gestantes en China en el que se encontró una mayor prevalencia del alelo G en el polimorfismo rs1083096 del gen *MTNR1B* en un grupo de gestantes con diabetes gestacional. En este estudio se sugiere la existencia de una sinergia de dicho polimorfismo con la edad materna y el índice de masa corporal, contribuyendo al riesgo de desarrollar diabetes gestacional en estas mujeres ([Y. Jia et al., 2020](#)).

Tabla 10. Estudio de genotipado. Comparación de gestación control versus diabetes gestacional diagnosticada en primer trimestre (DG1).

GEN	SNP	Alelo riesgo	Alelo no riesgo	RAF Control	RAF DG1	Odds Ratio	IC (95%)	p-valor
<i>MTNR1B</i>	rs10830963	G	C	0,19	0,53	4,695	1,896 - 11,63	0,0005
<i>MTNR1B</i>	rs1387153	T	C	0,25	0,47	2,647	1,103 - 6,354	0,0270

En la tabla se describe de izquierda a derecha el nombre del gen, el código del SNP, el alelo de riesgo y no riesgo para ese polimorfismo, la frecuencia del alelo de riesgo (RAF), el valor calculado de la Odds Ratio, el intervalo de confianza del 95% y el *p-valor*. Las diferencias en la frecuencia alélica calculada para el alelo de riesgo se analizaron mediante un test de Chi-cuadrado. Se consideraron resultados estadísticamente significativos si el *p-valor* es <0.05.

Como se ha comentado más arriba en nuestro estudio hemos visto que el polimorfismo rs10830963 se asocia específicamente con el grupo de diabetes gestacional con diagnóstico temprano (DG1) y, precisamente, en este grupo el IMC de las gestantes con diabetes es significativamente mayor que en las controles. La segunda variante, es decir la rs1387153, en mujeres con DG1, indica que la

presencia del alelo T supone un riesgo de desarrollo de diabetes gestacional de inicio temprano aproximadamente 2,6 veces mayor en las mujeres portadoras de este alelo que en las que presentan el alelo C.

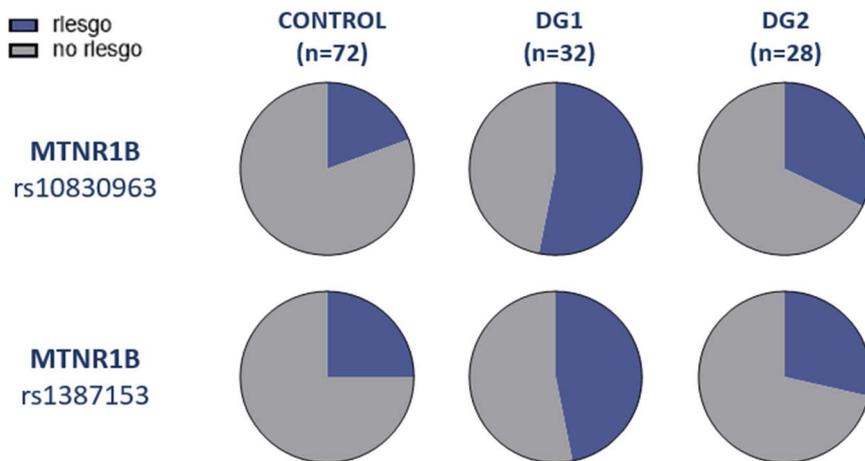


Figura 11. Representación gráfica de frecuencia alélica de los polimorfismos de *MTNR1B*. En la figura se muestran los resultados de frecuencia alélica de aquellos genes en los que se observa una diferencia entre los grupos control, diabéticas de diagnóstico en primer trimestre (DG1) y diabéticas con diagnóstico en segundo trimestre (DG2). El alelo de riesgo se representa en color azul, mientras que el alelo de no riesgo se representa en color gris. N, representa el número de alelos analizados.

Como comentamos anteriormente, en nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que describe estos resultados en población caucásica en relación con la diabetes gestacional. Y lo que es más interesante, esta variante también presenta una frecuencia alélica significativamente mayor en las gestantes con diabetes de diagnóstico en primer trimestre frente a las del grupo control, pero no a las gestantes con diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre.

Por tanto, la diferencia observada cuando se analizan todas las mujeres con diabetes gestacional juntas frente a las gestantes control, se debe exclusivamente a aquellas que desarrollan diabetes de forma temprana. Estos resultados podrían estar indicando una diferencia en la fisiopatología de estos dos grupos de mujeres con diabetes gestacional.

4.1.1.2.3 El polimorfismo rs5219 del gen *KCNJ11* se asocia con diabetes de aparición en el segundo trimestre.

En el análisis de los resultados del grupo de gestante que presentan diabetes gestacional diagnosticada en el segundo trimestre (DG2), encontramos menor frecuencia del alelo de riesgo en el polimorfismo rs5219 del gen *KCNJ11* (del inglés *potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 11*), tal y como se puede observar en la **Tabla 11** y **Figura 12**. Este gen codifica para la proteína Kir6.2, una de las isoformas de las subunidades formadoras de poros del canal de potasio sensible a ATP. Esta proteína se expresa en las células β pancreáticas y regula la secreción de insulina estimulada por glucosa.

El gen *KCNJ11* está asociado con la DM2 y sus complicaciones vasculares. Además de relacionarse con DM2, el polimorfismo rs5219 de *KCNJ11* también se ha relacionado con hipertensión y otras complicaciones propias de la DM2 ([Rattanatham et al., 2021](#)).

Tabla 11. Estudio de genotipado. Comparación control *versus* diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre (DG2).

GEN	SNP	Alelo riesgo	Alelo no riesgo	RAF Control	RAF DG2	Odds Ratio	IC (95%)	p-valor
<i>KCNJ11</i>	rs5219	T	C	0,75	0,54	0,3846	0,1541 - 0,9597	0,0375

En la tabla se describe de izquierda a derecha el nombre del gen, el código del SNP, el alelo de riesgo y no riesgo para ese polimorfismo, la frecuencia del alelo de riesgo (RAF), el valor calculado de la Odds Ratio, el intervalo de confianza del 95% y el *p-valor*. Las diferencias en la frecuencia alélica calculada para el alelo de riesgo se analizaron mediante un test de Chi-cuadrado. Se consideraron resultados estadísticamente significativos si el *p-valor* es <0.05.

En la bibliografía hay escasos artículos en los que se relaciona el gen *KCNJ11* con la diabetes gestacional. De hecho, solo hemos encontrado el estudio de 2015 que reporta una mayor susceptibilidad a la diabetes gestacional a consecuencia de la presencia del alelo T en la variante rs5219 del gen *KCNJ11* ([Shaath et al., 2005](#)). En nuestro estudio la frecuencia del alelo de riesgo es menor en el grupo de gestantes con DG2 que en el grupo control. Por otro lado, se han descrito otros polimorfismos en este gen que no presentan relación alguna con susceptibilidad al desarrollo de diabetes gestacional, como el rs5210 ([X. Wang et al., 2017](#)).

A la vista de todos estos estudio no podemos afirmar que en población caucásica el alelo minoritario del polimorfismo rs5219 del gen *KCNJ11* genere susceptibilidad al desarrollo de diabetes gestacional. Sin embargo, si se ha visto un efecto protector del alelo mayoritario, alelo T, respecto al desarrollo de la patología.

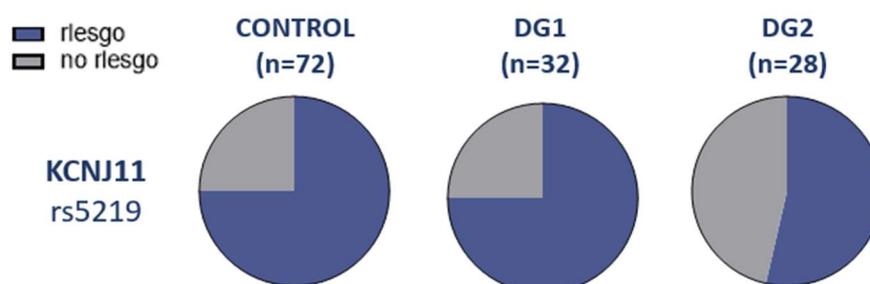


Figura 12. Representación gráfica de frecuencia alélica del polimorfismo de *KCNJ11*. En la figura se muestran los resultados de frecuencia alélica de aquellos genes en los que se observa una diferencia entre los grupos control, diabéticas de diagnóstico en primer trimestre (DG1) y diabéticas con diagnóstico en segundo trimestre (DG2). El alelo de riesgo se representa en color azul, mientras que el alelo de no riesgo se representa en color gris. N, representa el número de alelos analizados.

4.1.2.4 Consideraciones finales de los resultados del estudio de genotipado.

En base a los datos encontrado en la bibliografía existente, queda patente que la mayor parte de los estudios se han realizado en población asiática, fundamentalmente china. Los genotipos poblacionales son variables entre etnias, por lo que es de interés realizar este análisis en otras poblaciones. La existencia de resultados contradictorios según las poblaciones analizadas no tiene por qué ser sinónimo de polimorfismo "inútil", solamente requiere tener las frecuencias alélicas analizadas en cada una de las diferentes poblaciones, así como tener en cuenta el origen étnico del paciente a la hora de realizar el estudio de biomarcadores genéticos.

En este sentido, los resultados del presente estudio han confirmado la ausencia de asociación entre determinados polimorfismos y la diabetes gestacional, como el rs4994 del receptor β 3-adrenérgico, y por otra han confirmado la asociación de otros, como el polimorfismo rs10814916 de *GLIS3* o el rs4402960 del *IGF2BP2*. Particularmente resultan de interés los resultados que hemos obtenido en los polimorfismos rs1387153 y rs10830963 de *MTNR1B*, que han mostrado una asociación significativa en aquellas mujeres que desarrollan diabetes gestacional temprana, lo que les confiere un potencial valor predictivo de la enfermedad. Por ello pretendemos realizar un estudio dirigido para validar dichos resultados, lo cual permitiría, en aquellas mujeres portadoras de estos SNPs realizar una intervención previa a la gestación y/o un control más estricto para tratar de disminuir las complicaciones asociadas con la patología.

4.1.3 miRNAs circulantes como biomarcadores de diabetes gestacional de desarrollo en primer o en segundo trimestre de la gestación.

En la búsqueda de los mecanismos etiopatogénicos de la diabetes gestacional de inicio en primer o en segundo trimestre y en la búsqueda de nuevos marcadores diagnósticos y pronósticos de la enfermedad se planteó como segundo objetivo el análisis de los microRNA (miRNA) circulantes en las mujeres del estudio. Para ello, en primer lugar, se ha llevado a cabo un estudio de secuenciación de miRNA en el plasma de un grupo de las gestantes con y sin diabetes gestacional y, tras seleccionar los miRNA que podrían ser candidatos como biomarcadores de la enfermedad se validaron mediante RT-qPCR en la cohorte completa de mujeres que participaron en el estudio. En cada una de las muestras se extrajo el RNA tal y como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos preservando la integridad de los microRNA. Como en el estudio del genotipado, el análisis estadístico se realizó en primer lugar comparando los resultados de las gestantes con diabetes gestacional frente a los controles y, posteriormente, separando los grupos en dos subgrupos en función del momento del diagnóstico de la enfermedad.

En primer lugar, se realizó una representación de los resultados obtenidos en los recuentos normalizados (TMM) en el estudio de secuenciación en un *heat-map* (**Figura 13**) que incluye los 50 miRNA con mejor coeficiente de variación.

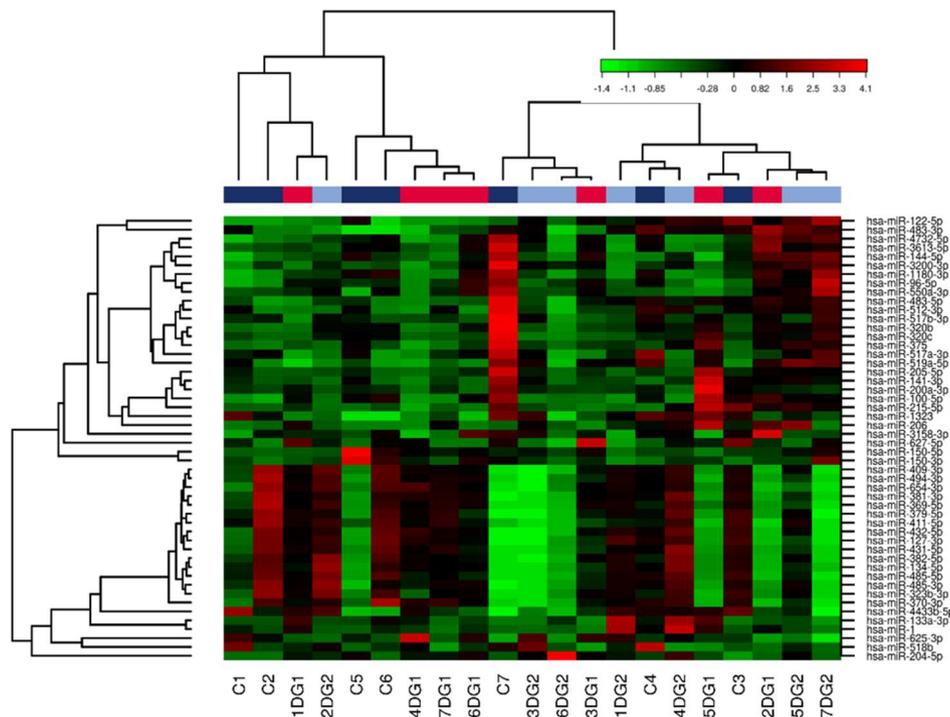


Figura 13. *Heat-map* y la agrupación jerárquica no supervisada por muestra y miRNA en el grupo de gestantes control (azul oscuro) y de mujeres con diabetes gestacional (DG1, rojo; DG2 azul claro). Se seleccionaron los 50 miRNA, presentes en todas las muestras, que tienen el mejor coeficiente de variación basado en los recuentos de TMM normalizado para cada miRNA para cada muestra.

Como se puede inferir de la **Figura 13**, algunos de estos miRNA mostraban diferencias entre los grupos. De todos los resultados obtenidos en este análisis de secuenciación se seleccionaron aquellos miRNAs que mostraban diferencias estadísticamente significativas entre el grupo control y el grupo de las gestantes con diabetes gestacional independientemente del momento del diagnóstico. Estos resultados se recogen en la **Tabla 12**. Como se puede ver se encontraron 7 miRNAs cuyos niveles circulantes presentaron diferencias en los distintos grupos. Así, los miRNAs hsa-miR-206 y hsa-miR-204-5p estaban significativamente aumentados en el plasma de las mujeres con diabetes gestacional frente al grupo control, mientras que los miRNAs hsa-miR-518b, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-548j-5p estaban disminuidos en el grupo de las gestantes diabéticas. De todos ellos el que mostró una diferencia mayor fue el hsa-miR-206, como se puede contrastar con el análisis mediante el *volcano plot* que se muestra en la **Figura 14**. De este grupo de miRNAs se seleccionaron para su posterior validación hsa-miR-206 y hsa-miR-224-5p.

Tabla 12. Niveles circulantes de miRNAs en plasma de mujeres control y mujeres con diabetes gestacional.

miRNA	CONTROL (TMM)	DG (TMM)	LogFC	P-valor
hsa-miR-206	5	15	1,57	0,0120
hsa-miR-518b	22	13	-0,74	0,0311
hsa-miR-204-5p	14	24	0,81	0,0315
hsa-miR-224-5p	98	58	-0,75	0,0338
hsa-miR-142-3p	6652	4737	-0,49	0,0420
hsa-miR-150-5p	14115	8120	-0,80	0,0463
hsa-miR-548j-5p	72	47	-0,62	0,0481

En la tabla se muestran los resultados del estudio de secuenciación. Se muestra para cada miRNA el valor normalizado de conteo (TMM) en el grupo de *mujeres con control* y el de mujeres con diabetes gestacional; Logaritmo del *Fold Change* (LogFC); la comparación se ha realizado con un test de exactas asumiendo una distribución binomial negativa. Se consideraron resultados estadísticamente significativos $p < 0.05$.

Con el objetivo de estudiar en profundidad el perfil de miRNAs dentro del grupo de diabéticas, se dividió el grupo en aquellas que desarrollaron diabetes en el primer (DG1) o en el segundo (DG2) trimestre de gestación.

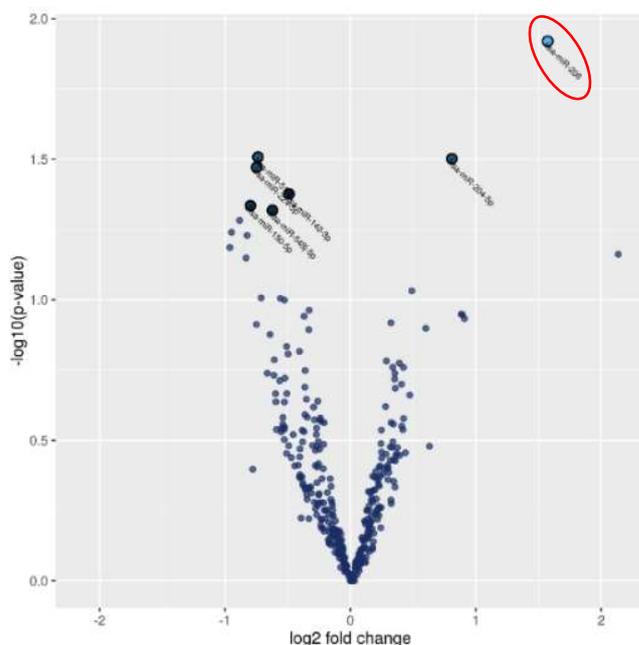


Figura 14. Volcano plot de gestantes control versus las gestantes con DG.

El gráfico muestra la relación entre el p-valor y el cambio entre los grupos del número de veces en los niveles circulantes miRNA normalizado. Los miRNA con los valores más bajos están marcados con nombres en la gráfica.

En la **Tabla 13** se recogen los miRNAs que presentan diferencias entre el grupo control y las diabéticas de primer trimestre. Como se puede ver, el perfil de miRNAs hsa-miR-1299 y hsa-miR-206 se encuentran elevados en el plasma del grupo de gestantes con DG1. Por el contrario, los niveles plasmáticos de hsa-miR-518b, hsa-miR-224-5p, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-517b-3p, hsa-miR-517a-3p en el grupo de mujeres DG1 es inferior al de las gestantes control. En el análisis del *volcano plot* (**Figura 15**) se

observa claramente el aumento de los niveles circulantes de hsa-miR-206 y hsa-miR-1299, y la disminución de hsa-miR-224-5p y hsa-miR-518b en el grupo de las gestantes con diabetes de aparición temprana respecto a las gestantes control.

Tabla 13. Niveles circulantes de miRNAs en plasma de mujeres control y mujeres con diabetes gestacional diagnosticada en primer trimestre.

miRNA	CONTROL (TMM)	DG1 (TMM)	LogFC	P-valor
<i>hsa-miR-1299</i>	5	41	2,95	0,0063
<i>hsa-miR-206</i>	5	16	1,73	0,0092
<i>hsa-miR-518b</i>	22	10	-1,04	0,0107
<i>hsa-miR-224-5p</i>	96	48	-1,00	0,0108
<i>hsa-miR-512-3p</i>	17	8	-1,10	0,0353
<i>hsa-miR-517b-3p</i>	15	7	-1,08	0,0354
<i>hsa-miR-517a-3p</i>	14	7	-0,99	0,0436

En la tabla se muestran los resultados del estudio de secuenciación. Se muestra para cada miRNA el valor normalizado de conteo (TMM) en el grupo de mujeres con control y el de mujeres con diabetes gestacional diagnosticada en primer trimestre (DG1); Logaritmo del *Fold Change* (LogFC); la comparación se ha realizado con un test de exactas asumiendo una distribución binomial negativa. Se consideraron resultados estadísticamente significativos $p < 0.05$.

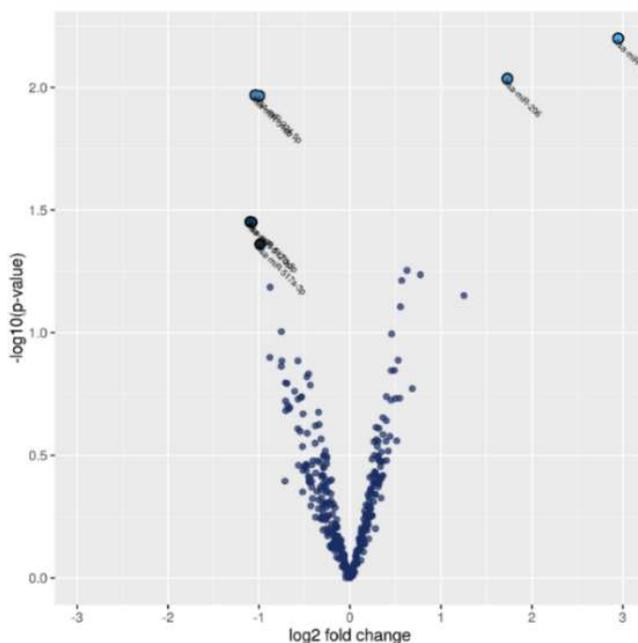


Figura 15. Volcano plot de gestantes control versus las gestantes con DG1. El gráfico muestra la relación entre los p-valores y el cambio del número de veces en los niveles circulantes miRNA normalizada entre los grupos. Los miRNA con los valores más bajos están marcados con nombres en la gráfica.

Al comparar los resultados entre el grupo control y el grupo de mujeres con DG2 (Tabla 14), observamos que solo se encuentran diferencias en los niveles circulantes de dos miRNAs en el plasma, hsa-miR-204-5p y hsa-miR-206 ambos aumentados en el grupo de mujeres con DG2. Estos resultados se visualizaron también con el *volcano plot* (Figura 16), en donde se puede observar claramente la diferencia en el hsa-miR-204-5p.

Tabla 14. Niveles circulantes de miRNAs en plasma de mujeres control y mujeres con diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre.

miRNA	CONTROL (TMM)	DG2 (TMM)	LogFC	P-valor
<i>hsa-miR-204-5p</i>	14	32	1,22	0,0094
<i>hsa-miR-206</i>	5	13	1,41	0,0149

En la tabla se muestran los resultados del estudio de secuenciación. Se muestra para cada miRNA el valor normalizado de conteo (**TMM**) en el grupo de mujeres con control y el de mujeres con diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre (DG2); Logaritmo del Fold Change (**LogFC**); la comparación se ha realizado con un test de exactas asumiendo una distribución binomial negativa. Se consideraron resultados estadísticamente significativos $p < 0.05$.

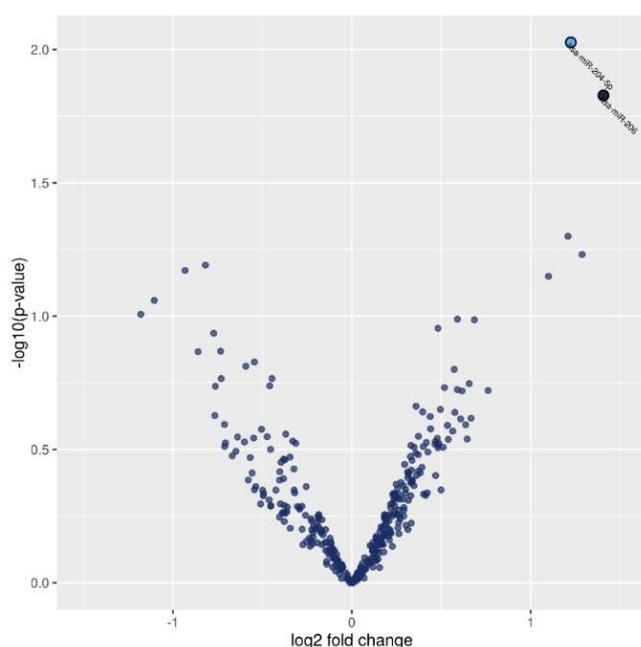


Figura 16. Volcano plot de gestantes control versus las gestantes con DG2. El gráfico muestra la relación entre los p-valores y el cambio del número de veces en los niveles circulantes miRNA normalizada entre los grupos. Los miRNA con los valores más bajos están marcados con nombres en la gráfica.

Las diferencias que existen entre el nivel circulante de miRNAs en el grupo de diabéticas de primer frente a las de segundo trimestre, se muestran en la **Tabla 15**. En ella podemos observar cómo los niveles de *hsa-miR-885-3p*, *hsa-miR-4669*, *hsa-miR-210-3p* son significativamente más altos en el grupo DG2 que en el DG1. Por el contrario, los miRNAs *hsa-miR-23b-5p*, *hsa-miR-1299* y *hsa-miR-452-5p* presentan un nivel más bajo en el grupo de mujeres DG2 que en las DG1.

En el análisis del *volcano plot* (**Figura 17**) se puede visualizar una diferencia especialmente marcada en el caso de *hsa-miR-885-3p*, que como se puede ver es significativamente mayor su presencia en el plasma del grupo de mujeres con DG2 respecto a DG1.

Tabla 15. Niveles circulantes de miRNAs en plasma de mujeres diabetes gestacional diagnosticada en primer trimestre y mujeres con diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre.

miRNA	DG1 TMM	DG2 TMM	LogFC	P-valor
hsa-miR-885-3p	4	16	-1,83	0,0033
hsa-miR-4669	0	5	-2,75	0,0102
hsa-miR-23b-5p	19	10	0,89	0,0109
hsa-miR-1299	42	5	2,82	0,0188
hsa-miR-452-5p	2	6	-1,29	0,0244
hsa-miR-210-3p	17	30	-0,77	0,0315

En la tabla se muestran los resultados del estudio de secuenciación. Se muestra para cada miRNA el valor normalizado de conteo (**TMM**) en el grupo de mujeres con diabetes gestacional de primer trimestre (DG1) y el de mujeres con diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre (DG2); Logaritmo del Fold Change (**LogFC**); la comparación se ha realizado con un test de exactas asumiendo una distribución binomial negativa. Se consideraron resultados estadísticamente significativos *p- <0.05.

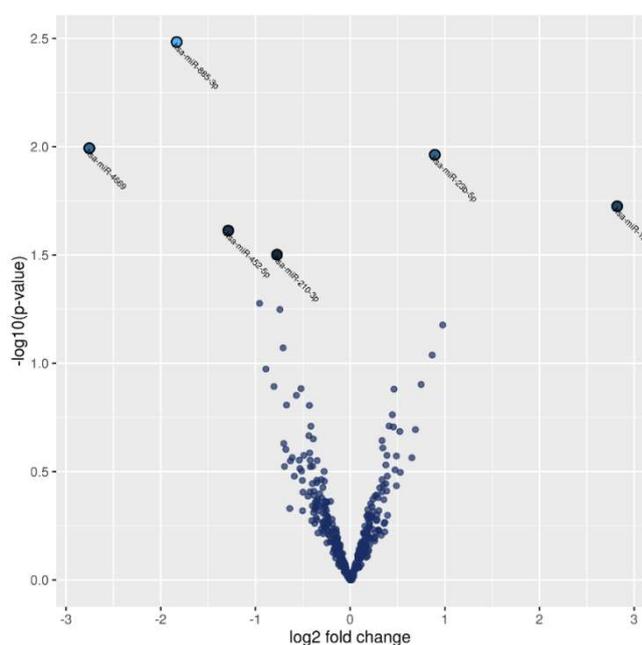


Figura 17. Volcano plot de gestantes con DG2 versus DG1. El gráfico muestra la relación entre los p-valores y el cambio del número de veces en los niveles circulantes miRNA normalizada entre los grupos. Los miRNA con los valores más bajos están marcados con nombres en la gráfica.

4.1.3.1 Validación de los niveles circulantes de miRNA por RT-qPCR

De todos los miRNA que se identificaron en el estudio de secuenciación con diferencias en los niveles circulantes entre los distintos grupos de las mujeres gestantes, se seleccionaron aquellos que presentaban las diferencias más significativas entre los grupos y se validó su presencia por PCR a tiempo real en todo el grupo de mujeres que participaron en el estudio. Como posibles biomarcadores diferenciales de DG1 y DG2 se escogieron hsa-miR-885-3p, hsa-miR-1299 y hsa-miR-23b-5p. Por otra parte, como posibles biomarcadores de diabetes gestacional, independientemente del momento del diagnóstico, se seleccionaron los miRNAs hsa-miR-206, hsa-miR-224-5p. Para la validación de los miRNA candidatos se realizó la extracción de RNA en las mismas condiciones que para la secuenciación. De todos ellos, tras la validación solo encontramos diferencias significativas en los miRNAs, hsa-miR-206 y hsa-miR-

224-5p. Es por ello que en este apartado solo hablamos de aquellos miRNAs que fueron validados por RT-qPCR y mostraron diferencias en los niveles circulantes entre los grupos.

Dado que los microRNA participan en diversos procesos fisiopatológicos, han cobrado importancia en los últimos años como posibles biomarcadores diagnóstico y pronóstico de enfermedades. Muchos de ellos se han relacionado con las alteraciones que tienen lugar en distintos tipos de cáncer, por su relación con procesos de inflamación, diferenciación, metabolismo, proliferación, hemostasia y apoptosis. Aunque también se ha ampliado el estudio de miRNAs en relación con otras enfermedades. En nuestro estudio hemos centrado la atención en la asociación de los microRNA y la gestación, la diabetes y la diabetes gestacional. En la bibliografía hay estudios recientes en los que se relacionan algunos perfiles de microRNA y la diabetes gestacional ([T. N. Zhang, Wang, Huang, & Gao, 2021](#)), aunque en ellos no hemos encontrado ninguna descripción en relación de miR-206 y miR-224-5p con esta patología. Si bien es verdad que los resultados obtenidos al analizar los niveles de miR-206 claramente apuntan al aumento de estos en el plasma de las gestantes con diabetes gestacional, los resultados en el caso del miR-224-5p resultan contradictorios entre la secuenciación y la validación, por lo que no son concluyentes y haría falta profundizar en el estudio de este miRNA en diabetes gestacional.

4.1.3.1.1 hsa-miR-206 como posible biomarcador de diabetes gestacional.

De forma similar a lo que encontramos en el estudio de secuenciación en la validación por RT-qPCR en un número mayor de muestras se observó también un aumento significativo en los niveles circulantes del miR-206 en el grupo de gestantes con diabetes gestacional respecto del grupo control. Aunque en la secuenciación cuando separamos el grupo de diabéticas, observamos que en las que se diagnosticó la enfermedad en primer trimestre de gestación los niveles de miR-206 se encontraban elevados en el respecto a las gestantes control, en los estudios de validación no encontramos mismos resultados. Si bien es verdad que miR-206 se encuentra aumentado en las gestantes con DG1, este aumento no llega a ser significativo. Sin embargo, en el caso de las DG2 si se observó un aumento significativo respecto al grupo control ($p=0,0439$) (**Figura 18**). Este miRNA participa en diferentes procesos biológicos, como los que se muestran en la **Tabla 16**.

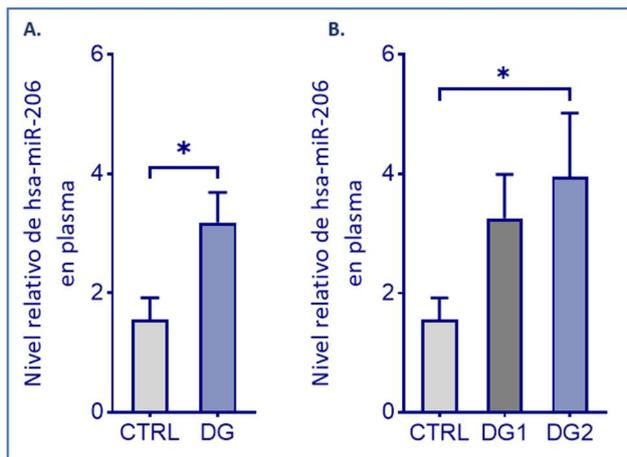


Figura 18. Niveles circulantes de hsa-miR-206 en plasma de gestantes control y gestantes con diabetes gestacional. A: análisis comparativo entre el grupo control (CTRL) y el grupo de mujeres con diabetes gestacional (DG); B: la comparación de los niveles de expresión clasificando las gestantes con diabetes gestacional diagnosticada en primer trimestre (DG1) y en segundo trimestre (DG2). El análisis se realizó mediante el test *U de Mann Whitney*. Se consideraron estadísticamente significativas diferencias con un $*p < 0.05$.

Tabla 16. Procesos biológicos en los que participa miR-206

	GO	Fold enrichment
Diferenciación de condrocitos	GO:0002062	13,42
Regulación negativa de migración celular	GO:0030336	5,97
Regulación de la polimerización de filamentos de actina	GO:0030833	3,58
Regulación del desarrollo de la proyección de neuronas	GO:0010975	3,19
Regulación de la transcripción por la RNA polimerasa II	GO:0006357	1,51

Los miRNAs interactúan con distintos transcritos de genes regulando así su expresión, como mecanismo de regulación postranscripcional. miR-206 es una molécula compuesta por 21 bases y que en el hombre se ubica en el cromosoma 6p12.2.

Este miRNA fue descrito por primera vez en músculo esquelético, ya que es el tejido en el que se expresa de forma mayoritaria. Por ello, se clasificó en la familia de los miRNA específicos de músculo y denominada myomiR (R. Liu et al., 2020). Los myomiR, presentan una identidad completa en la secuencia semilla para el reconocimiento de la diana del RNA mensajero. Se ha atribuido al miR-206 un papel regulador de la diferenciación de mioblastos del músculo esquelético, donde la sobreexpresión de miR-206 promueve la diferenciación del mioblasto (Przanowska et al., 2020). En nuestro estudio hemos encontrado una elevación de los niveles de miR-206 en el grupo de mujeres con diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre, respecto a las gestantes control. En la literatura no hemos encontrado muchos estudios en los que se relacione miR-206 con la diabetes gestacional. Con el objetivo de conocer mejor la función de este microRNA y buscando su posible asociación con la diabetes gestacional, se ha hecho un análisis bibliográfico para tratar de identificar los posibles genes diana de miR-206, su mecanismo de acción y las rutas en las que está implicado.

Numerosos estudios han abordado el papel de miR-206 en la homeostasis y el metabolismo de la glucosa, principalmente la glucólisis, en diferentes situaciones fisiopatológicas. Una cuestión importante

cuando se analizan miRNAs circulantes es el tejido o tejidos que estarían contribuyendo a los niveles detectados en la circulación. Como se ha comentado anteriormente, el músculo esquelético es el tejido que presenta una mayor expresión de miR-206. Precisamente, se ha propuesto que miR-206 estaría implicado en la ausencia de expresión de GCK en el músculo, generando así el reemplazo funcional de GCK con HK2, que puede ser inhibida alostéricamente por la glucosa-6-fosfato (G6P) con lo que se prevendría de este modo la glucólisis descontrolada ([LaPierre & Stoffel, 2017](#)). El papel de miR-206 en la regulación postranscripcional de la GCK también se ha demostrado en el hígado ([Vinod et al., 2016](#)). Dado que una inducción en la expresión de la GCK promueve la utilización hepática de la glucosa, su inhibición por miR-206 estaría favoreciendo la intolerancia a la glucosa.

En un trabajo reciente se ha encontrado una asociación entre miR-206 y la regulación de otras enzimas que participan en la homeostasis de la glucosa. En este contexto, se ha observado como la sobreexpresión de miR-206 disminuye la expresión de hexoquinasa 2 (HK2) en células de cánceres de pulmón no microcítico. En el estudio se propone que en este tipo de células el miR-206 regula la glucólisis aerobia, ya que la disminución de HK2 disminuiría la captación de glucosa, la producción de lactato y la generación de ATP ([Jia, Feng, Tong, Tao, & Xu, 2020](#)). Se sabe que algunos RNA largo no codificante (lncRNA, del inglés *long non coding RNA*) participan en la regulación de la expresión de microRNAs. Así, se ha descrito que el miR-206 está regulado por el lncRNA gen 14 del hospedador de RNA nucleolar pequeño (SNHG14) en células de cáncer de pulmón no microcítico. Este lncRNA actúa inhibiendo la expresión de miR-206, el cual por su parte inhibe la expresión de la glucosa-6 fosfato deshidrogenasa (G6PD). Todo ello apunta al eje SNHG14/miR-206/G6PD como posible diana terapéutica en este tipo de cáncer, ya que la inhibición de la expresión de miR-206 en células tumorales mediada por SNHG14, activa la expresión de G6PD, promoviendo así la viabilidad del cáncer y la invasión y migración de las células ([L. Zhao, Zhang, Shi, & Teng, 2020](#)). En otros trabajos se ha identificado como diana del miR-206 a la piruvato quinasa (PK), una de las tres enzimas limitantes de la glucólisis. La regulación de la expresión de PK está dirigida por PTBP1 (proteína 1 de unión al tracto de polipirimidina), considerada como un oncogen cuyo transcrito presenta una región de unión a miR-206. Particularmente PTBP1 regula la expresión de la isoforma M de la PK (PK_M), fundamentalmente en cerebro y musculo esquelético. Por tanto, la expresión de miR-206 disminuiría los niveles de PTBP1 en el músculo, promoviendo así un aumento en la expresión de la isoforma 1 de PK_M ([Taniguchi et al., 2018](#)), y por ende la actividad glucolítica del tejido. Sin embargo, una desregulación de este miRNA favorecería una disminución de esta enzima (PK-M1) en el músculo favoreciendo el efecto Warburg asociado a procesos tumorales ([Taniguchi et al., 2018](#)).

En este escenario, se podría especular que miR-206, a través de la inhibición de enzimas clave de la glucólisis como HK2 y PK_M, disminuiría la utilización de glucosa en tejidos extrahepáticos,

particularmente el músculo esquelético, junto con la y de esta forma contribuiría a la intolerancia a la glucosa de las gestantes diabéticas.

Aunque la expresión de miR-206 se ha atribuido clásicamente al músculo, se ha detectado miR-206 en otros tejidos que expresan GCK. En un modelo murino, se ha visto que los islotes pancreáticos también expresan miR-206, participando en la regulación postranscripcional de la glucoquinasa (GCK) ([Iannone et al., 2020](#)). Así, se ha visto que la expresión de miR-206 aumenta en respuesta a la alimentación con HFD (del inglés *High Fat Diet*), y ello estaría implicado en la intolerancia a la glucosa y alterada secreción de insulina estimulada por glucosa en estos ratones ([Vinod et al., 2016](#)). Sin embargo, en un estudio en el que se determinó la expresión de miR-206 en los islotes pancreáticos humanos y su participación en la regulación de la GCK, no encontró correlación entre ambos parámetros ([Liang et al., 2020](#)). Más estudios serían necesarios para confirmar si el papel de miR-206 sobre la GCK en humano difieren con lo descrito anteriormente en las células β - pancreáticas de ratón.

También se ha identificado el efecto de miR-206 sobre la señalización de la insulina. Así, se ha observado en riñón que el aumento de la expresión de miR-206 es responsable de la regulación a la baja de PTP1B, con la consiguiente mejora de la señalización de la insulina, protegiendo a los podocitos glomerulares contra las lesión inducida por la fructosa y la subsiguiente proteinuria ([Mirra et al., 2018](#)).

También se ha identificado el efecto de miR-206 sobre el metabolismo de los lípidos y la lipogénesis, por ello, se ha propuesto a miR-206 como un posible agente terapéutico para la hepatoesteatosis o la hiperglucemia ([H. Wu et al., 2017](#)). En este contexto se ha descrito que miR-206 regula la expresión de los receptores X del hígado (LXR) en los macrófagos. El aumento de miR-206 en el macrófago aumenta la expresión de LXR α . La activación de este receptor en los macrófagos promueve la salida de colesterol, y previene la resistencia a la insulina. Se ha descrito como la activación de LXR α a su vez disminuye los niveles de miR-206 por lo que parece que ambos presentan un mecanismo de retroalimentación ([Y. Zhang, Sun, Icli, & Feinberg, 2017](#)). En este sentido, ya en 2013 se publicó un artículo en el que se postula que el miR-206 puede suprimir la lipogénesis hepática y podría utilizarse junto a miR-1 como diana terapéutica en patologías asociadas con la lipogénesis ([Zhong et al., 2013](#)). Estudios realizados en preadipocitos muestran como miR-206 inhibe la diferenciación de la línea 3T3-L1 a través de la vía de señalización c-Met/PI3K/AKT, donde se vió como la sobre expresión de c-Met antagoniza el efecto de miR-206 sobre la adipogénesis ([R. Tang et al., 2017](#)).

En relación con diabetes, se ha descrito que los niveles de miR-206, se encuentran aumentados en el suero de los pacientes con diabetes tipo 1 que presentan una atrofia muscular progresiva ([Koutsoulidou et al., 2015](#)). Hasta la fecha no conocemos ningún estudio en el que se haya abordado el papel de miR-206 en la diabetes gestacional, aunque si hay algunos realizados en gestación, en los que

han descrito el papel de miR-206 en relación con patologías como la preeclampsia o la restricción del crecimiento intrauterino. Diversos estudios han demostrado que la expresión de miR-206 aumenta tanto en placentas como en la circulación de gestantes con preeclampsia ([Y. Li & Liu, 2020](#));([H. Y. Wu, Wang, Liu, & Zhang, 2020](#)). Además, en un estudio de 2020 mostraron que el lncRNA del transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis (MALAT1) se encuentra regulado a la baja en las placentas de pacientes con preeclampsia. El miR-206 es una diana directa de MALAT1 y miR-206 inhibe la expresión de IGF-1, el cual está involucrado en la migración e invasión del trofoblasto modulando la ruta de señalización Pi3K/Akt. En este contexto, los autores del trabajo propusieron que en las placentas con preeclampsia la regulación a la baja de MALAT1, aumentaría los niveles de miR-206 inhibiendo la expresión de IGF-1, lo que conduce a la reducción en la invasión del trofoblasto ([H. Y. Wu et al., 2020](#)). Recientemente se ha publicado una revisión en la que se han identificado, en función del sexo fetal, los distintos perfiles de expresión de microRNA en en blastocisto humano de 5 días de desarrollo procedentes de fecundación *in vitro*. En este estudio se menciona que la expresión de miR-206 se encuentra aumentada en blastocistos de sexo fetal femenino ([Vari et al., 2021](#)).

El gen endotelina 1 (*ET1*) se ha asociado en la literatura con el riesgo al desarrollo de preeclampsia en gestantes, señalándola como una de las moléculas implicadas en el efecto endotelial sistémico materno producido por la disfunción placentaria. Precisamente se ha descrito a *ET1* como gen diana del miR-206. Precisamente, en un estudio en el que también se han observado mayores niveles plasmáticos de miR-206 en las gestantes con preeclampsia, se detectaron menores niveles circulantes de *ET1*, y una correlación negativa entre ambos parámetros ([Sheng, Zhao, & Zhu, 2020](#)).

Además del papel de miR-206 en la regulación postranscripcional de genes de implicados en el metabolismo y su regulación por la insulina, una cuestión de interés es las vías a través de las cuales se regularía a la alza este microRNA. Se han descrito diferentes procesos/mecanismos que regulan la expresión de miR-206, entre los que parece jugar un papel relevante la vía mTOR, una vía de señalización básica en la regulación del metabolismo, la proliferación y la diferenciación celular, así como en la modulación del sistema inmune y los mecanismos de autofagia. Precisamente se ha descrito que tanto AMPK como mTOR se encuentran aumentadas en la placenta de mujeres con DG, probablemente por la hiperglucemia ([K. Tsai et al., 2021](#)). Precisamente, se ha visto que la inhibición de la vía mTOR en condiciones de malnutrición o ayuno disminuye el factor de transcripción miogénico MyoD y por lo tanto la expresión de miR-133b y miR-206 en el músculo esquelético ([Iannone et al., 2020](#)). En este contexto se podría pensar que la hiperglucemia de la gestante sea responsable del incremento de miR-206 que tiene lugar en la diabetes gestacional.

En nuestro estudio hemos encontrado, a diferencia de lo esperado, en las gestaciones con DG una disminución en el peso de los recién nacidos respecto a los recién nacidos de gestaciones de mujeres con

normoglucemia. En un estudio de 2020, se mostró como miR-206 a través de la interacción con el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que como sabemos participa en la angiogénesis, contribuyendo al retraso en el crecimiento intrauterino. En este estudio los autores encontraron una correlación negativa entre VEGF y miR-206, por lo que propusieron que miR-206 sería un potencial biomarcador de restricción del crecimiento intrauterino (Y. Li & Liu, 2020). Así pues, se podría especular que el menor peso de los recién nacidos en nuestro estudio podría estar relacionado con el aumento del miR-206, y el hecho de que este grupo de mujeres mantuvieron un muy buen control de la glucemia durante la gestación. No obstante, los estudios de correlación entre el peso del recién nacido y los niveles de miR-206 plasmáticos en las gestantes no mostraron ninguna asociación si bien es verdad, es en el grupo de DG2 en el que se encuentra mayor nivel de miR-206 y menor peso al nacer. Por tanto, no podríamos concluir que esta disminución en el peso se deba al aumento del miR-206, y más estudios serían necesarios para abordar esta relación.

4.1.3.1.2 hsa-miR-224-5p aumentado en diabetes gestacional diagnosticada en segundo trimestre.

En el estudio de secuenciación observamos que el miR-224-5p está disminuido significativamente en la cohorte de mujeres con diabetes gestacional respecto al grupo de gestantes control, sin embargo, la validación del miRNA en un número mayor de muestras no se observó esa diferencia. Sin embargo, como se muestra en la figura 15, la cantidad de este miRNA está aumentada en el grupo de las DG2 respecto a las DG1 como se puede ver en la **Figura 19**. En la **Tabla 17** se muestran los procesos biológicos en los que está implicado este miRNA.

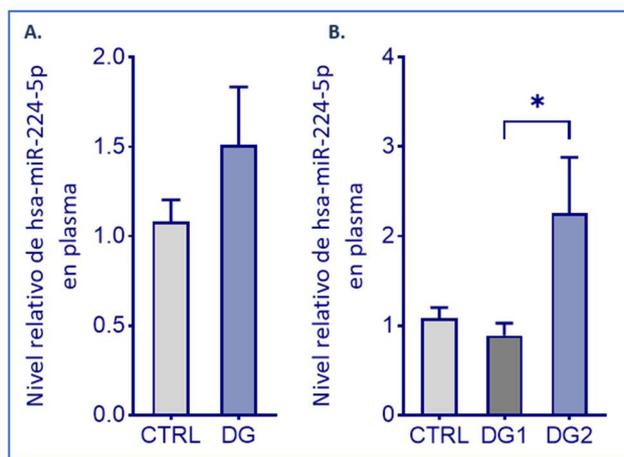


Figura 19. Niveles circulantes de hsa-miR-224-5p en plasma de gestantes control y gestantes con diabetes gestacional. A: análisis comparativo entre el grupo control (CTRL) y el grupo de mujeres con diabetes gestacional (DG); B: comparación de los niveles de expresión clasificando a las gestantes con diabetes gestacional diagnosticada en primer trimestre (DG1) y en segundo trimestre (DG2). El análisis se realizó mediante el test *U de Mann Whitney*. Se consideraron estadísticamente significativas diferencias con un $*p < 0.05$.

Tabla 17. Procesos biológicos en los que participa miR-224p-5p	GO	Fold enrichment
Regulación positiva de procesos catabólicos	GO:0009896	4,22
Proceso de modificación de proteínas celulares	GO:0006464	1,61
Regulación del proceso metabólico de compuestos nitrogenados	GO:0051171	1,42
Regulación del proceso metabólico primario	GO:0080090	1,42
Regulación del proceso metabólico de las macromoléculas	GO:0060255	1,36

El papel del miR-224-5p en procesos tumorales está ampliamente descrito en la literatura, en diversos tipos de cáncer ([Furuya et al., 2021](#); [Kuasne et al., 2017](#)). De hecho, se ha propuesto como biomarcador diagnóstico y pronóstico en cánceres del sistema digestivo, siendo el carcinoma hepatocelular uno de los más relacionados con el hsa-miR-224-5p ([Y. Wang, Wang, et al., 2021](#); [F. Zhou, Li, Meng, Qi, & Gu, 2013](#)). Pese a estar ampliamente descrito en cáncer, el número de publicaciones se reduce en relación con la diabetes.

En este sentido se ha encontrado que pacientes portadores de la mutación en el gen de factor nuclear 1 α del hepatocito (*HNF1A*), descrito como la forma más común de diabetes tipo MODY, presentan niveles elevados de miR-224-5p en el plasma con respecto a los controles ([Bonner et al., 2013](#)). También se ha descrito la regulación de la expresión de miR-224-5p mediada por el lncRNA MALAT1, por lo que este lncRNA regula tanto la expresión de miR-206 como la de miR-224-5p. En un estudio realizado en 2020 se señala al eje MALAT1/miR-224-5p/NLRP3 en relación con el daño producido a las células del sistema nervioso a consecuencia de la DM2 complicada con la apnea obstructiva del sueño. Por ello este trabajo propone este eje como diana, para evitar el deterioro cognitivo en pacientes con DM2 y apnea ([Du, Wang, Han, & Feng, 2020](#)).

Nuestro estudio muestra resultados controvertidos entre la secuenciación y la validación en los niveles de miR-224-5p en las gestantes con diabetes. Se ha descrito que otros factores pueden influir en los niveles elevados de miR-224-5p en sangre, como el consumo de cigarrillos electrónicos, identificado en un estudio basado en el análisis de exosomas circulantes ([K. P. Singh et al., 2020](#)). No conocemos si algunas de las mujeres que participaron en el estudio eran consumidoras de este tipo de cigarrillos y por ello se han obtenido diferencia entre la secuenciación y la validación. Sería conveniente realizar el estudio en un mayor número de muestras, teniendo en cuenta este posible factor en las entrevistas a las pacientes.

4.2 OBJETIVO 2: Resultados y discusión

DISEÑO DEL ESTUDIO

Estudio experimental transversal de casos y controles. Los sujetos de estudio son mujeres embarazadas con diagnóstico de preeclampsia (n=18) y embarazadas sanas, normotensas, como grupo control (n=24) del Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario La Paz de Madrid. En el grupo de gestantes control se incluyeron gestaciones tanto simples (n=20) como gemelares, dicoriónicas-diamnióticas (n=4). El grupo de preeclampsia incluye 18 gestantes con embarazo simple. En todos los casos de preeclampsia, ésta se clasificó en base al momento de aparición de la patología. Aquellas mujeres que manifestaron hipertensión y proteinuria antes de la semana 34, formaron parte del grupo de mujeres con preeclampsia de aparición temprana (PE; n = 9), mientras que aquellas mujeres cuya preeclampsia se presentó después de la semana 34 de gestación, se clasificaron dentro del grupo de preeclampsia tardía (PL; n = 9). Estas muestras se analizaron agrupadas en dos estudios, la distribución de los grupos en cada estudio se detalla en la **Figura 20**. La recogida de los datos clínicos de las gestantes se realizó al ingreso y tras el parto, estos datos se pueden ver en la **Tabla 18** donde se recogen la media y desviación estándar de los mismos en cada grupo de estudio. Los datos clínicos recogidos del recién nacido se muestran de la misma forma en la **Tabla 19**.

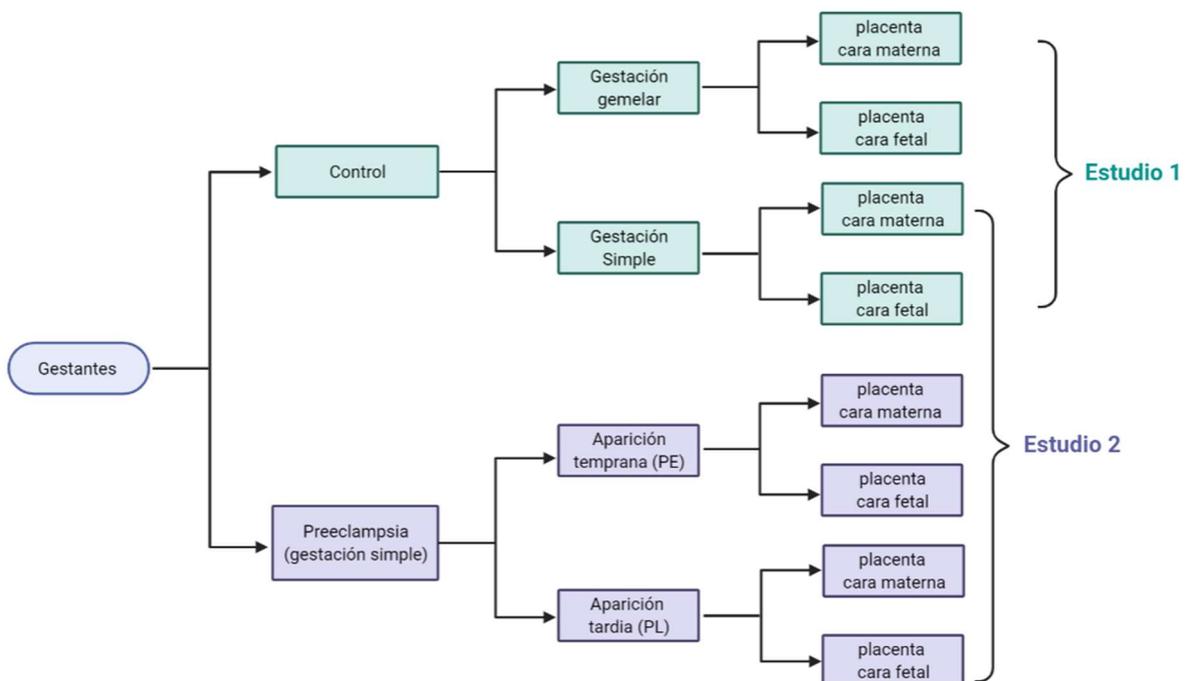


Figura 20. Diseño del estudio de expresión génica en placenta de gestantes de tercer trimestre.

Los criterios de inclusión utilizados para el reclutamiento de las mujeres gestantes con diagnóstico de preeclampsia se basaron en dos parámetros. Por un lado, la presencia de hipertensión (>140/90 mmHg), de aparición después de la semana 20 de gestación y proteinuria superior a 300mg en orina de 24 h. Como grupo control, se seleccionaron gestantes sanas normotensas que no hubieran experimentado complicaciones médicas ni obstétricas hasta el momento del parto. Así mismo los criterios de exclusión aplicados en ambos grupos fueron la presencia de malformaciones congénitas mayores, la falta de consentimiento informado, la participación de mujeres con historia previa de deficiencia congénita en el metabolismo de los ácidos grasos, hipertensión u otras enfermedades crónicas asociadas. En el grupo control además de los criterios de exclusión anteriores se incluyó también, la historia previa de hipertensión gestacional o preeclampsia y la presencia de fallo hepático agudo durante el embarazo o síndrome HELLP. Todos los datos personales de las mujeres participantes en el estudio están almacenados y custodiados en el Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Universitario La Paz de Madrid, de acuerdo con las leyes de Protección de Datos Europea y la Ley Española de Protección de Datos (Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre y Ley Orgánica 7/2021, de 26 de mayo). La identidad de los pacientes siempre permanecerá confidencial, se identificarán sólo por un código numérico individual. El nombre y la dirección no figurarán en ninguna información que salga del hospital para preservar su anonimato.

Toma de muestra

Las placentas de tercer trimestre utilizadas en el estudio fueron recogidas tras el alumbramiento. Se procedió a la retirada de las membranas fetales e inmediatamente después se tomaron dos secciones, una correspondiente a la cara fetal de la placenta, en la región próxima a la inserción del cordón umbilical, y la otra, correspondiente a la cara materna, a partir del cotiledón situado en el lado opuesto a la inserción del cordón. Las muestras fueron congeladas (-80°C) de inmediato. Todas las muestras se conservaron en el biobanco del Hospital Universitario de la Paz, en Madrid, hasta el momento de su procesamiento. Los parámetros bioquímicos en la sangre de las gestantes fueron analizados por el Servicio de Análisis Clínicos del Hospital Universitario La Paz. Los datos de PIGF y sFlt-1 circulantes utilizados en el estudio de correlación de expresión génica con parámetros materno fetales no se han incluido en las Tablas 18 y 20, ya que son datos no publicados que forman parte de una tesis doctoral dirigida por el Dr. J.L. Bartha.

Como se ha comentado, el objetivo de este estudio era profundizar en el conocimiento del metabolismo de la placenta. Para ello se realizó un análisis de expresión de genes relacionados con el metabolismo lipídico, transportadores de nutrientes, así como de proteínas involucradas en la proliferación celular y angiogénesis. Todos los genes estudiados se recogen en la **Tabla 6** en el apartado de materiales y métodos. Los genes de referencia utilizados en el estudio fueron *GAPDH* y *RPL30*.

4.2.1 Estudio 1: Análisis de gestaciones no patológicas simples y gemelares.

En primer lugar, se comentarán los resultados obtenidos en el análisis de placentas de tercer trimestre de gestaciones sencillas y gemelares no patológicas, mostrando los resultados clínicos, que caracterizan la cohorte de estudio, así como el análisis de ambas caras de la placenta.

4.2.1.1 Características clínicas de las gestantes con gestaciones no patológicas simples y gemelares.

Como se puede observar en la **Tabla 18**, donde se recogen los datos clínicos relevantes para el estudio, las mujeres con gestaciones gemelares presentan mayor ganancia de peso durante la gestación y mayores niveles de LDL y triglicéridos circulantes en sangre en relación con las gestantes de un único feto. La edad gestacional del parto en el caso de los gemelos es más baja que en las gestaciones simples. Por otro lado, como se puede ver en la **Tabla 19** tanto el peso de la placenta como el peso del recién nacido son más bajos en las gestaciones gemelares que en las gestaciones simples. Uno de los datos importantes y que podría suponer una limitación del estudio es que todas las gestaciones gemelares proceden de la utilización de técnicas de reproducción asistida. En la **Figura 21** se puede observar las diferencias aquí comentadas.

Tabla 18. Datos clínicos maternos y obstétricos de la cohorte de estudio

Parámetros (unidades)	Simple (n= 20)	Gemelar (n =4)
Edad materna (años)	36,25 ± 4,54	35,00 ± 3,93
Ganancia de peso (kg)	12,78 ± 5,09	18,75 ± 2,66
IMCi (Kg/m ²)	23,07 ± 2,78	23,45 ± 2,65
Edad gestacional (semanas)	39,37 ± 0,90	37,75 ± 0,46
Colesterol (mg/dL)	246,45 ± 44,55	285,75 ± 38,09
Colesterol-LDL (mg/dL)	135,50 ± 40,00	186,50 ± 44,47
Colesterol-HDL (mg/dL)	73,05 ± 17,15	65,00 ± 15,77
Triglicéridos (mg/dL)	214,90 ± 73,08	434,25 ± 111,62
Ácidos grasos libres (mmol/L)	189,45 ± 239,12	195,75 ± 41,61
Glucosa (mg/dl)	74,25 ± 5,11	74,50 ± 3,74
Insulina (μU/mL)	10,58 ± 3,96	12,50 ± 5,73
Péptido C (ng/mL)	1,62 ± 0,48	1,90 ± 0,83
Índice HOMA-IR	1,95 ± 0,75	2,30 ± 1,05

En la tabla se muestra la media y la desviación estándar de distintos parámetros de las mujeres en cada uno de los grupos estudiados, así como datos propios de la gestación como la edad gestacional.

Tabla 19. Datos clínicos fetales de la cohorte de estudio

Parámetros (unidades)	Simple (n= 20)	Gemelar (n =8)
Peso placenta (g)	609,16 ± 148,03	519,75 ± 40,30
Peso del recién nacido (g)	3418,75 ± 427,94	2764,38 ± 243,48
Percentil del recién nacido	56,15 ± 28,54	71,38 ± 22,01

En la tabla se muestra la media y la desviación estándar de distintos parámetros del recién nacido en cada uno de los grupos estudiados. Recién nacido (RN)

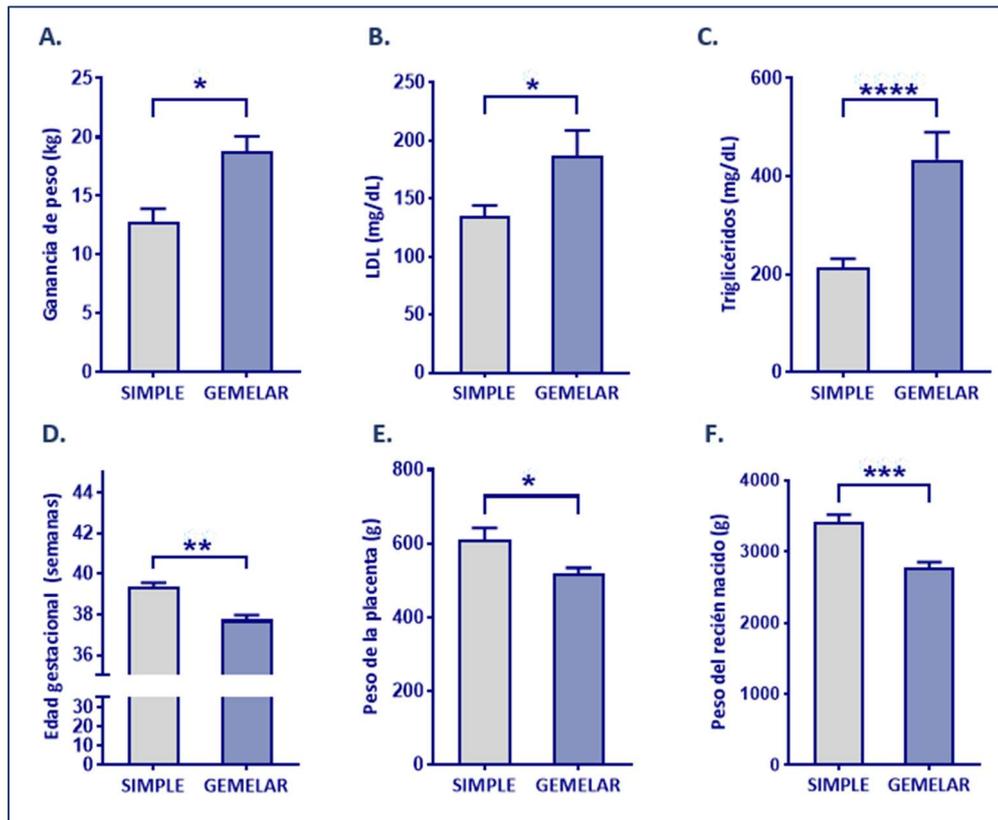


Figura 21. Análisis de los datos clínicos maternos fetales y obstétricos en gestaciones simples y gemelares. En las gráficas se representa la media y el error estándar. El análisis se realizó mediante el test *U de Mann Whitney*. Se consideraron resultados estadísticamente significativos * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

4.2.1.2 Análisis del nivel de mRNA y proteína en las distintas caras de la placenta no patológicas en gestaciones simples y gemelares

Para profundizar en el conocimiento del estado de la placenta de tercer trimestre en gestaciones gemelares se procedió al análisis de la cantidad de mRNA y proteínas. Las proteínas estudiadas, como se comentó en el apartado de materiales y métodos, son proteínas que participan en el transporte de nutrientes, en el metabolismo lipídico de la placenta (**Ilustración 1**) y en procesos de señalización, angiogénesis o proliferación celular. Los resultados del análisis de dichas proteínas se muestran a continuación.

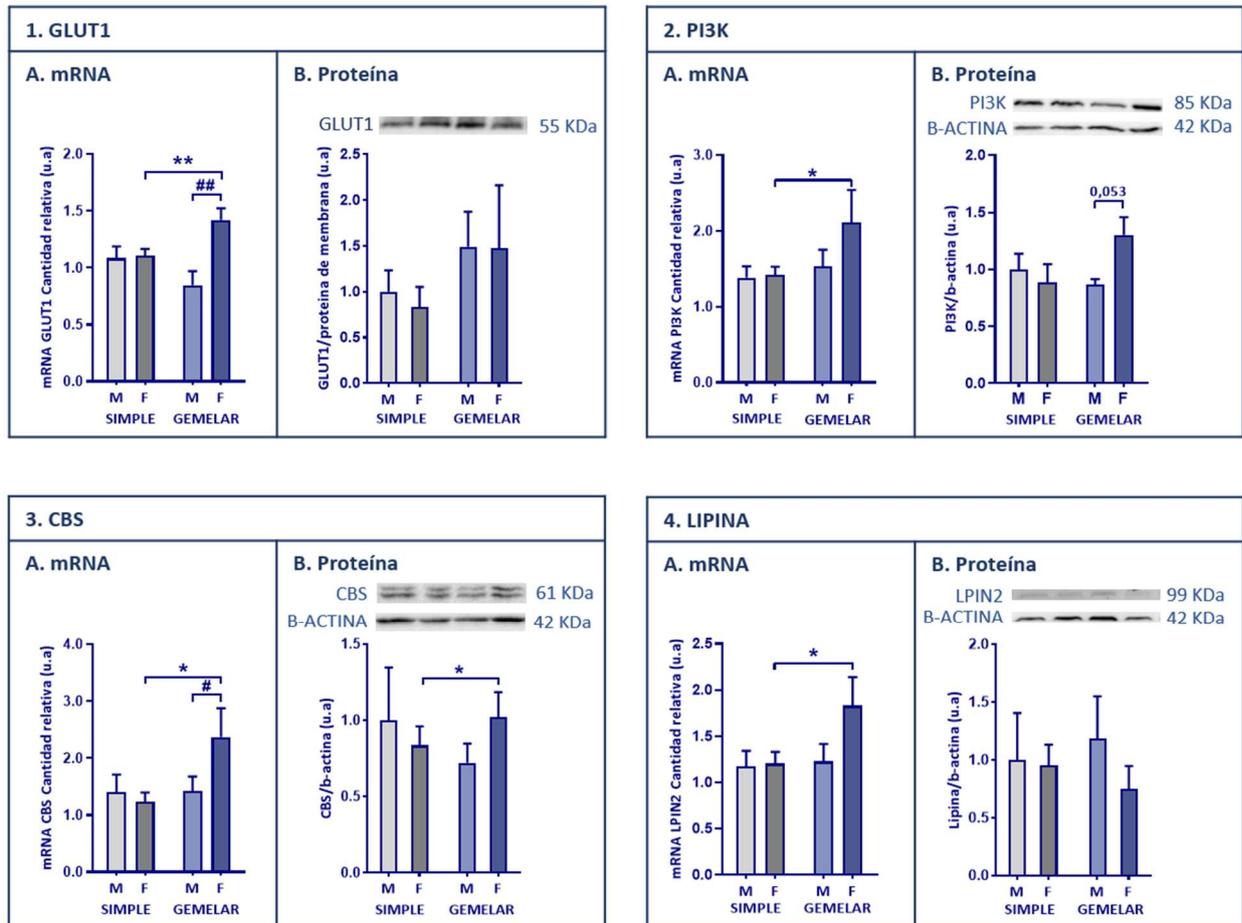


Figura 22. Nivel de mRNA relativo y nivel de proteínas en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones simples y gemelares. En la figura se muestran los resultados obtenidos de la determinación de los niveles, de mRNA por RT-qPCR (A) y de proteínas por western blot (B), del transportador de glucosa (*GLUT1*, 1), del fosfatidilinositol 3 quinasa (*PI3K*, 2), la cistationina β sintasa (*CBS*, 3), y lipina (*LPIN2*, 4). En las gráficas se representa la media y el error estándar. Las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F), de una misma placenta se analizaron mediante la prueba de Wilconxon. Se consideraron resultados estadísticamente significativos $\#p < 0.05$ y $\#\#p < 0.01$ (F vs. M). Las diferencias entre las placentas de parto simple (gris) y parto gemelar (azul), se analizaron mediante la prueba *U-Mann Whitney*. Se consideraron resultados estadísticamente significativos $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$ (G vs. S).

En relación con el estudio de los transportadores de nutrientes, podemos ver como el transportador de glucosa, GLUT1, se encuentra aumentado en la cara fetal de las placentas gemelares **Figura 22.1**, esta diferencia la encontramos a nivel de mRNA, como se puede ver en el apartado **A**, sin embargo cuando analizamos las proteínas por *western-blot* no se observan diferencias estadísticamente significativas (**Figura 22.1.B**), si bien es verdad que parecen encontrarse mayores niveles de proteína en las placentas procedentes de gestaciones gemelares. Como se puede observar en la **Figura 24**, en la que se recogen resultados obtenidos en el estudio de los transportadores de nutrientes, en ningún otro transportador se ha encontrado diferencias en los niveles de mRNA en la cara materna y fetal de las placentas simples y gemelares.

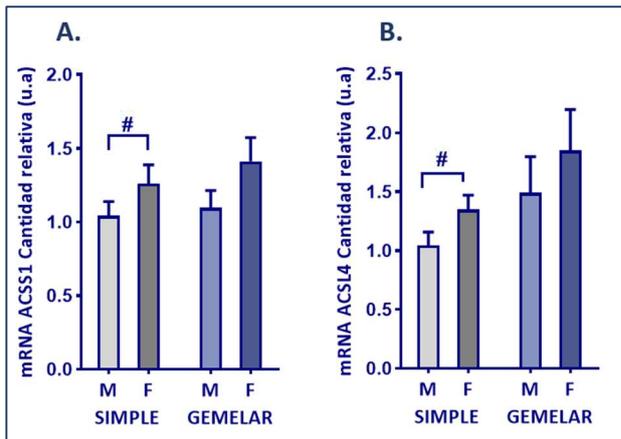


Figura 23. Nivel de mRNA relativo en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones simples y gemelares. Determinación de mRNA por RT-qPCR, del acil-CoA sintasa de cadena corta (ACSS1, **A**), acil-CoA sintasa de cadena larga (ACSL4, **B**). En las gráficas se representa la media y el error estándar. Las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F), de una misma placenta se analizaron mediante la prueba de *Wilcoxon*. Se consideraron resultados estadísticamente significativos # $p < 0.05$ (F vs. M). Las diferencias entre las placentas de parto simple (gris) y parto gemelar (azul), se analizaron mediante la prueba *U-Mann Whitney*.

En cuanto a las proteínas que participan en el metabolismo de la placenta hemos encontrado que la cistationina β sintasa (CBS) proteína involucrada en el metabolismo de homocisteína (**Figura 22.3**) y la lipina (LPIN2), enzima involucrada en la esterificación de triglicéridos, así como en la regulación del metabolismo lipídico (**Figura 22.4**), presentan mayores niveles de mRNA en la cara fetal de las placentas gemelares (**Figura 22.3.A** y **22.4.A** respectivamente). Estas diferencias a nivel de proteína no se encontraron en el caso de lipina 2 (**Figura 22.4.B**). Por su parte, los resultados del western-blot de la enzima CBS en las placentas sigue un perfil similar al observado para el mRNA, apuntando a que en las gestaciones gemelares la cantidad de la enzima es significativamente más alta en la cara fetal que en la cara materna de la placenta. Por otro lado, hemos encontrado en las placentas procedentes de gestación simples, mayores niveles de mRNA de enzimas del metabolismo de ácidos grasos como ACSS1 y ACSL4 en la cara fetal de las placentas respecto a la cara materna (**Figura 23**). El resto de las proteínas analizadas que participan en el metabolismo lipídico de la placenta no mostraron distintos niveles de mRNA en las placentas procedentes de gestaciones no patológicas simples y gemelares, ni en su cara materna ni en su cara fetal (**Figura 25**).

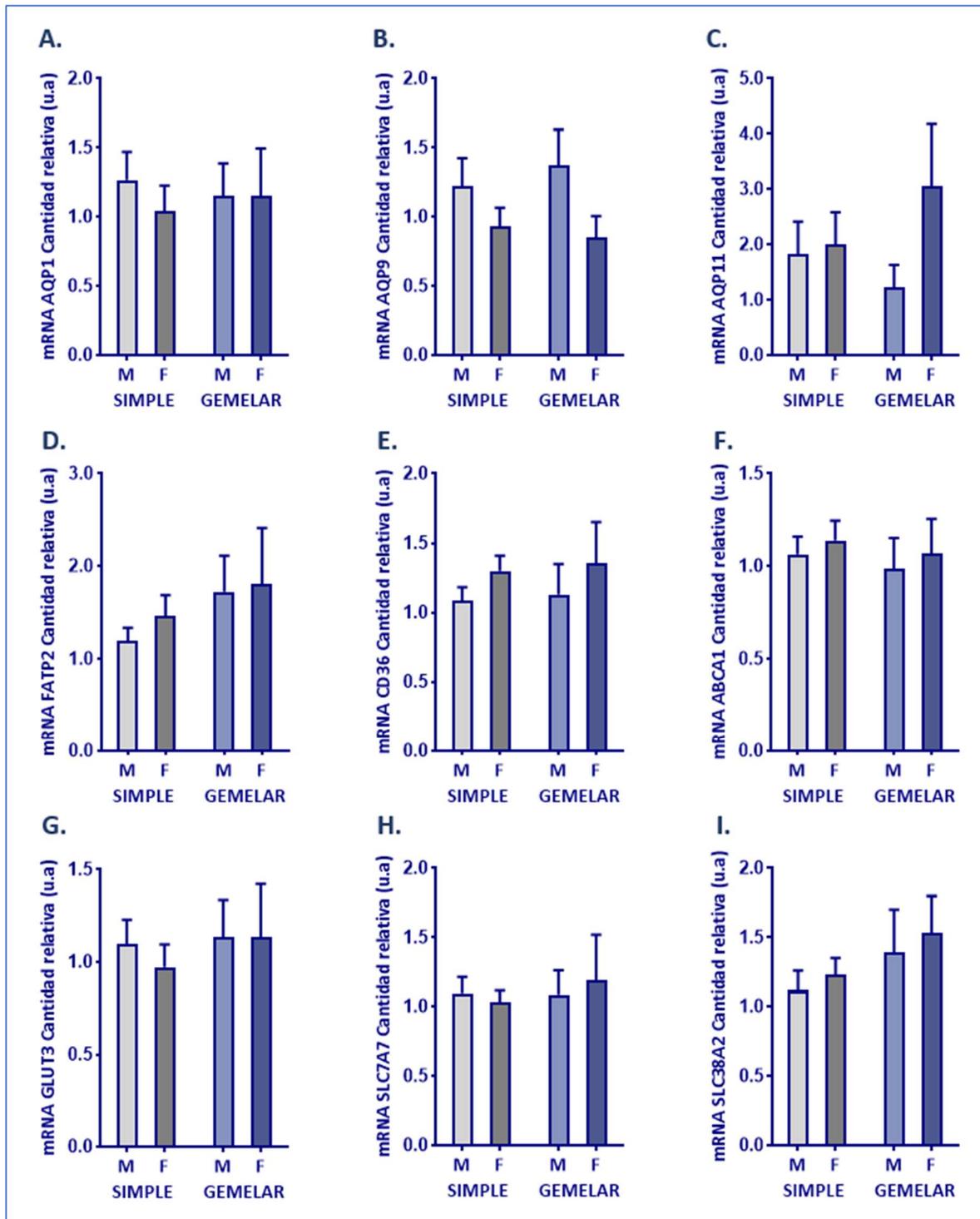


Figura 24. Nivel de mRNA relativo de proteínas que participan en el transporte de nutrientes, en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones simples y gemelares. Determinación de mRNA por RT-qPCR, de acuaporina 1 (AQP1, A), acuaporina 9 (AQP9, B), acuaporina 11 (AQP11, C), el transportador de ácidos grasos (FATP2, D), la translocasa de ácidos grasos (CD36, E), el transportador de colesterol (ABCA1, F), el transportador de glucosa (GLUT3, G), el transportador de ácidos grasos (SLC7A7, H) y (SLC38A2, I). En las gráficas se representa la media y el error estándar. Se analizaron las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F), mediante la prueba de Wilcoxon. Se analizaron las diferencias entre las placentas procedentes de parto simple (gris) y parto gemelar (azul) mediante la prueba U-Mann Whitney.

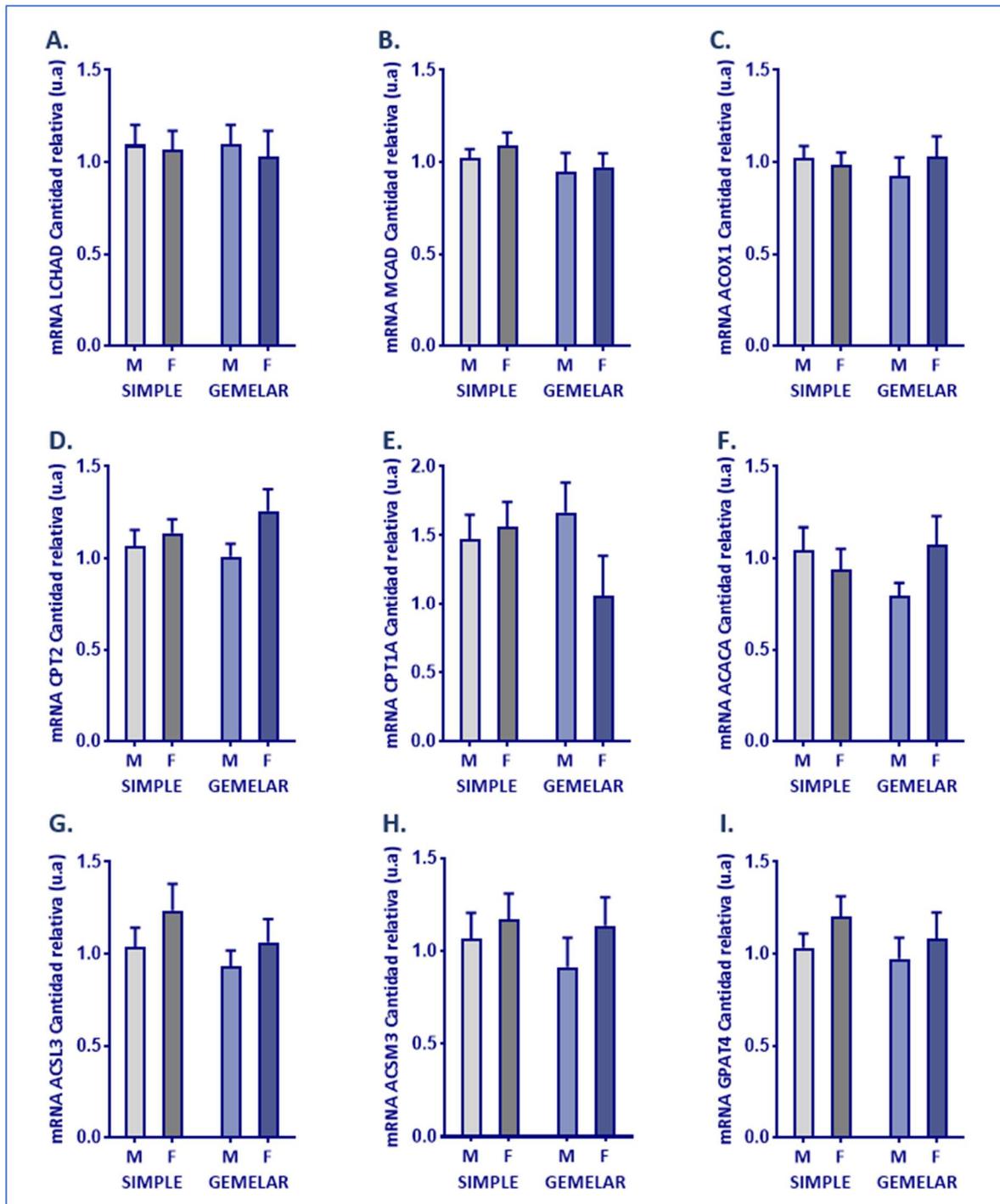


Figura 25. Nivel de mRNA relativo de proteínas que participan en el metabolismo lipídico de la placenta, en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones simples y gemelares. Determinación de mRNA por RT-qPCR, de la enzima hidroxil-CoA deshidrogenasa (*LCHAD*, A), Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (*MCAD*, B), Acil-CoA Oxidasa 1 (*ACOX1*, C), carnitina palmitoil transferasa 2 (*CPT2*, D), carnitina palmitoil transferasa 1 A (*CPT1A*, E), Acetil-CoA carboxilasa α (*ACACA*, F), Acil-CoA sintasa 3 de cadena larga (*ACSL3*, G), Acil-CoA sintasa 3 de cadena media (*ACSM3*, H) y la glicerol 3 fosfato aciltransferasa 4 (*GPAT4*, I). En las gráficas se representa la media y el error estándar. Se analizaron las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F), mediante la prueba de *Wilcoxon*. Se analizaron las diferencias entre las placentas procedentes de parto simple (gris) y parto gemelar (azul) mediante la prueba *U-Mann Whitney*.

Por último, las proteínas analizadas que participan en procesos de señalización como PI3K, proliferación celular como PTN y angiogénesis como sFLT1 y PGF, en la mayoría de los casos no mostraron diferencias entre los grupos de estudio como se puede ver en la **Figura 26**, a excepción de la proteína PI3K (**Figura 22.2**). Como se puede ver, tanto el mRNA (**A**) como la proteína (**B**) de PI3K, están aumentados en la cara fetal de las placentas gemelares respecto a la misma cara de las placentas de gestaciones sencillas, aunque en la proteína caso no llega a ser estadísticamente significativa. Sin embargo, en este caso observamos que la cantidad de PI3K en la cara fetal de las placentas gemelares es mayor que en la cara materna con un p-valor de 0,053, cercano a la significatividad estadística.

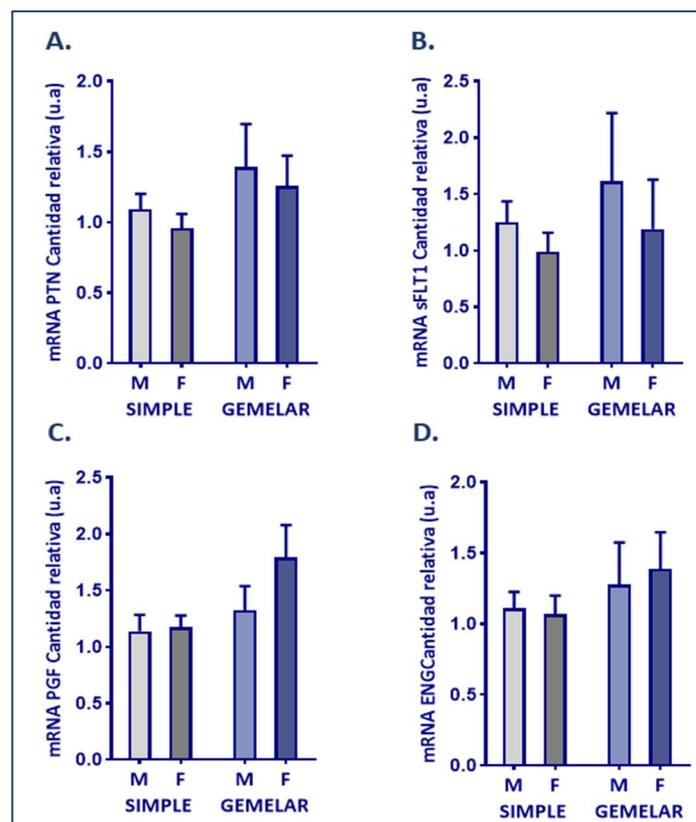


Figura 26. Nivel de mRNA relativo de proteínas que participan en procesos de proliferación celular (*PTN*, **A**) y angiogénesis (*sFLT1*, **B**, *PGF*, **C** y *ENG*, **D**), en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones simples y gemelares. Determinación de mRNA por RT-qPCR. Se analizaron las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F), mediante la prueba de *Wilcoxon*. En las gráficas se representa la media y el error estándar. Se analizaron las diferencias entre las placentas procedentes de parto simple (gris) y parto gemelar (azul) mediante la prueba *U-Mann Whitney*.

En el estudio publicado en 2021, mostramos como la oxidación de ácidos grasos es similar en ambas caras de la placenta, tanto en gestaciones simples como gemelares (**Figura 27.B**). Sin embargo, en la misma figura se puede observar que la esterificación en estas placentas si es diferente (**Figura 27.A**). Observamos como en las placentas gemelares, la esterificación parece superior a la que tiene lugar en las placentas de gestación simple. En el caso de las placentas simples, la cara materna presenta mayor nivel de esterificación que la cara fetal.

En las placentas gemelares el nivel de esterificación con ácidos grasos es igual en la cara materna que en la cara fetal. En este sentido encontramos diferencia estadísticamente significativa al comparar la cara fetal de las placentas simples con la cara fetal de las placentas gemelares, encontrando que, la esterificación en la cara fetal de las placentas gemelares es mayor que en las placentas simples. Es evidente viendo la figura que la oxidación en la placenta de tercer trimestre en comparación con la esterificación es mayor, además se hace patente en la representación del ratio FAE/FAO (**Figura 27.C**), en el que todos los valores obtenidos en el análisis se encuentran por debajo de 1. Llama la atención que las placentas analizadas muestren mayor acúmulo de triglicéridos en la cara fetal, tanto en gestaciones simples como en gestaciones gemelares, sin embargo, el análisis estadístico no muestra diferencias dada la gran dispersión de los datos. Por lo que parece que la cara fetal de la placenta presenta un perfil de almacenamiento lipídico mayor que la cara materna, tanto en gestaciones simples como en gestaciones gemelares ([Abascal-Saiz et al., 2021](#)).

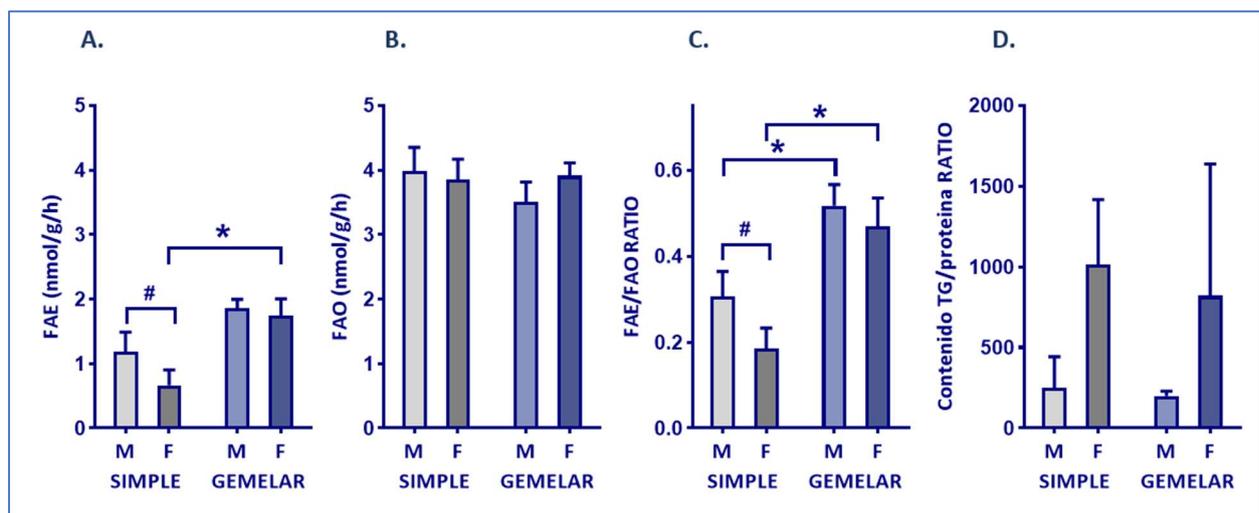


Figura 27. Análisis del metabolismo lipídico de la placenta. Representación de la oxidación (FAO) y la esterificación (FAE) de los ácidos grasos en la placenta, el ratio de ambas y el contenido en triglicéridos acumulados en la placentas corregido por la cantidad de proteína. Se representan los resultados de la media y el error estándar de la media, del estudio realizado previamente por el grupo ([Abascal-Saiz et al., 2021](#)). Las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F), de una misma placenta se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon. Se consideraron resultados estadísticamente significativos #p <0.05 (F vs. M). Las diferencias entre las placentas de parto simple (gris) y parto gemelar (azul), se analizaron mediante la prueba U-Mann Whitney. Se consideraron resultados estadísticamente significativos *p <0.05.

Los resultados obtenidos en el estudio de expresión génica en estas placentas van en consonancia con los estudios metabólicos, ya que como se puede ver en la **Figura 25**, no encontramos diferencias en la expresión de enzimas de la oxidación de los ácidos grasos (FAO). Sin embargo, sí observamos un aumento de LPIN2, enzima que participa en la esterificación de triglicéridos y la regulación del metabolismo lipídico. Además, también se ha encontrado aumentada la expresión de GLUT1, CBS y PI3K, en la cara fetal de los gemelos, lo que parece indicar una mayor actividad metabólica de la cara fetal de

las placentas gemelares respecto de la cara fetal de las placentas sencillas. Por su parte la acil-CoA sintetasa de cadena corta y larga se encuentran aumentadas en la cara fetal de las placentas simples, pudiendo estar relacionado con la disminución en la esterificación en esta cara de la placenta.

En la bibliografía se ha descrito como en mujeres obesas se observa un aumento en la síntesis y esterificación de ácidos grasos en la placenta y una disminución en su oxidación ([Visiedo et al., 2015](#)). En nuestro estudio hemos visto que las gestantes con embarazos gemelares presentan una mayor ganancia de peso durante la gestación, por lo que este aumento en la adiposidad de la madre podría estar asociado con la mayor esterificación y acúmulo de triglicéridos en las placentas. Por otra parte, estas mujeres tienen mayores niveles circulantes de LDL-colesterol y triglicéridos, por lo que el suministro de nutrientes a las placentas es presumiblemente mayor, lo cual, asociado con una mayor captación por la placenta estaría favoreciendo la tendencia al almacenamiento de recursos energéticos. No debemos olvidar que es necesario cubrir los requerimientos, en este caso, de dos fetos. Por ello todo apunta a que los cambios que hemos observado en las placentas de embarazos gemelares se tratan de mecanismos adaptativos del metabolismo materno y de las placentas con el fin de garantizar el correcto aporte de nutrientes a los dos fetos.

Para profundizar en los resultados del comportamiento de las dos caras de la placenta en gestaciones simples y gemelares se llevó a cabo un estudio de correlación entre la expresión génica en la placenta, los parámetros maternos, fetales, obstétricos (Figura 28) y los parámetros metabólicos de la placenta como la β -oxidación de ácidos grasos (FAO), la esterificación de triglicéridos (FAE) y el acúmulo de triglicéridos en la placenta (Figura YYY). Para tener una visión global del análisis estos resultados se muestran agrupados en forma de Heat-map donde se representa el valor de la *Rho* de *Spearman* (*Sp*) y el *p-valor*. Como se puede observar en el gráfico, las placentas procedentes de gestaciones gemelares presentan un mayor número de correlaciones, entre los parámetros clínicos estudiados y la expresión génica, en comparación con las gestaciones sencillas. Mientras que el número de correlaciones en la cara materna y la cara fetal de la placenta no presenta tantas diferencias.

Al analizar las correlaciones que se producen en las distintas caras de las placentas simples (**Figura 28**), vemos que algunas de ellas son más llamativas. Por ejemplo, se aprecia que en la cara fetal de éstas existe una acusada correlación entre los niveles de expresión de algunas proteínas y los niveles de colesterol asociado a HDL circulante (cHDL). Siendo esta correlación positiva en todos los casos excepto en el caso de la ACACA que es negativa. Así mismo, es especialmente fuerte la asociación entre cHDL y la expresión de LCHAD. Por otra parte, el transportador de ácidos grasos FATP2 y la ENG presentan la misma asociación en ambas caras de la placenta, a diferencia del resto de proteínas estudiadas. La expresión de FATP2 presenta una correlación menor en la cara fetal que en la cara materna. Del mismo modo sucede con ENG, es decir, la asociación es menor en la cara fetal que en la cara materna. Llama la atención

también la fuerte asociación positiva entre el nivel de ácidos grasos circulantes maternos y la expresión de ENG y sFLT1 en la cara fetal de las placentas simples.

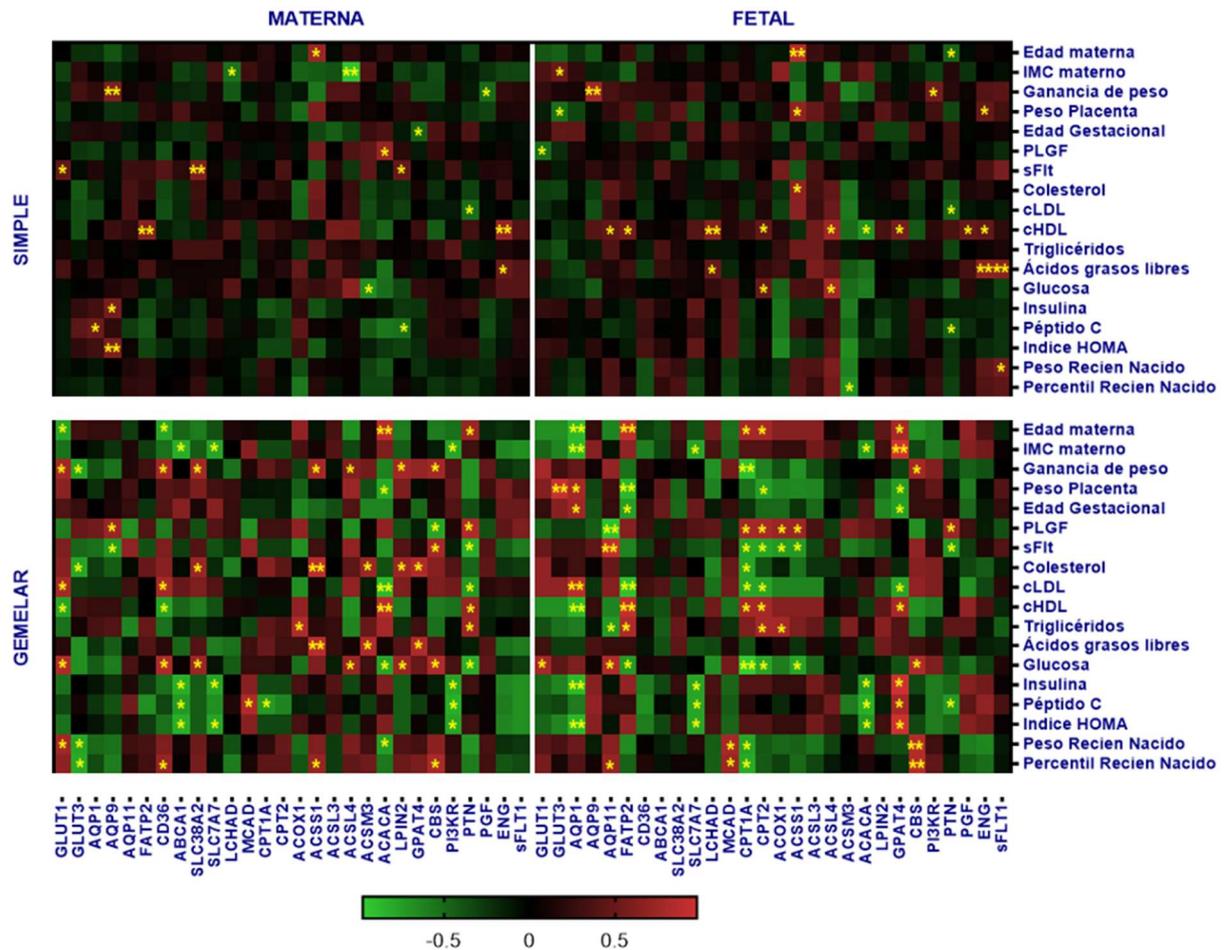


Figura 28. Heat-map en el que se representa la correlación entre los niveles de expresión génica de los distintos genes estudiados en placentas procedentes de gestaciones no patológicas y los parámetros clínicos maternos, fetales y obstétricos. El gráfico muestra el coeficiente de correlación de Spearman ($S\rho$) entre variables. Las correlaciones estadísticamente significativas se muestran como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. Los parámetros analizados son: edad materna (años), IMC materno pregestacional (Kg/m^2), ganancia de peso de la mujer durante la gestación (Kg), peso de la placenta (g), edad gestacional (semanas), PLGF (pg/ml), sFLT1 (pg/ml), colesterol total (mg/dl), colesterol asociado a LDL (cLDL, mg/dl), colesterol asociado a HDL (cHDL, mg/dl), ácidos grasos libres (mmol/L), glucosa (mg/dl), insulina ($\mu\text{U}/\text{mL}$), péptido C (ng/mL), índice HOMA, peso del recién nacido (g), percentil del recién nacido.

Al analizar las caras de las placentas gemelares, podemos ver la asociación existente en la cara fetal de la placenta, entre la expresión de proteínas involucradas en la oxidación de ácidos grasos (CPT1A, CPT2, ACOX1 y ACSL1) y de PTN, con los niveles circulantes de sFLT1 y PGF. Observándose una asociación opuesta para estos parámetros, esto es, positiva en relación con sFLT1 y negativa para PGF con respecto a los niveles de expresión génica. Sin embargo, el efecto es contrario cuando reparamos sobre la asociación con la expresión de AQP11. Es más, en el caso de los transportadores de nutrientes, aunque no presenten asociaciones significativas, la correlación de sFLT1 con la expresión de los transportadores es negativa, mientras que la asociación con PGF es positiva. Por otro lado, en la cara materna de las placentas gemelares, la asociación de los niveles circulantes de sFLT1 y PGF sobre la expresión de genes

no es tan marcada, solo se observa la correlación de AQP9 con PGF y sFLT1 y con PTN, que presenta la misma asociación en la cara fetal y en la cara materna; y sin embargo la CBS se asocia de forma contraria con estos factores en la cara materna PGF, sFLT1.

Una vez analizados los perfiles de correlación que existen entre las distintas caras, en las placentas simples y en las gemelares, analizaremos las diferencias más llamativas que se dan en gestación simple frente a gestación gemelar. Así podemos encontrar como la expresión en las placentas gemelares, tiene mayor asociación entre los parámetros de edad materna, el IMC y la ganancia de peso, con expresión en la cara materna de las placentas gemelares. Concretamente se encuentra una correlación negativa entre la edad materna y la expresión del GLUT1 y CD36 mientras que presenta una correlación positiva con ACACA y PTN, aunque esta asociación se encuentra en las placentas gemelares y no en las simples. Lo mismo ocurre en el caso de ABCA1, SLC7A7 y PI3K que correlacionan negativamente solo en el caso de las placentas gemelares con el IMC. Por otra parte, la ganancia de peso de las mujeres con gestaciones simples no se asocia con la expresión de las enzimas, sin embargo, en las placentas gemelares presenta asociación positiva con GLUT1, CD36, SLC38A2, ACSS1, ACSL4, LPIN2 y CBS y negativa con GLUT3. Es curioso como los niveles de colesterol, ácidos grasos y glucosa circulantes, correlacionan en la cara materna de las placentas gemelares fundamentalmente con enzimas del metabolismo lipídico y con transportadores, y esta asociación no se encuentra en la cara materna de las placentas simples. Así mismo encontramos mayor número de correlaciones en la cara materna de las placentas gemelares en relación con los parámetros del recién nacido (peso, percentil, pH de la arteria umbilical) que no encontramos en las gestaciones simples.

Si ahora centramos el análisis en la cara fetal de las placentas simples y gemelares, cabe señalar, que parecen estar más asociados los parámetros antropométricos maternos y la edad con la expresión de genes en las gestaciones gemelares en comparación con las sencillas. Llama especialmente la atención el efecto de sFLT1 y PGF circulante materno con algunas proteínas de la beta oxidación, así como con AQP11 y PTN. Es una asociación bastante marcada, además de una tendencia similar y opuesta entre sFLT1 y PGF, que no se encuentra en las placentas simples. Sin embargo, se dan más asociaciones de cHDL con la expresión de proteínas en las placentas simples que en las placentas gemelares. También podemos apreciar como en la cara fetal de las placentas gemelares hay proteínas que correlacionan con los niveles de glucosa e insulina, como son AQP1, SLC7A7, ACACA y GPAT4. Esta correlación encontrada en la cohorte de gestantes gemelares no se encuentra en la de gestantes simples. Por último, podemos ver como existe una correlación positiva entre MCAD y CBS con el peso y el percentil del recién nacido y como estos parámetros correlacionan negativamente con CPT1A en el caso de las placentas gemelares, algo que no encontramos en las sencillas.

Como se puede ver en el Heat map de correlación de la expresión de los genes estudiados con los parámetros metabólicos de la placenta (**Figura 29**), existe un mayor grado de correlaciones significativas en la cara fetal de las placentas gemelares. Si comparamos las diferencias que existen entre las correlaciones en las placentas simples y las gemelares en ningún caso sigue un perfil de asociación similar. Únicamente la expresión de PGF en la cara fetal de las placentas correlaciona negativamente con la FAO en la cara fetal.

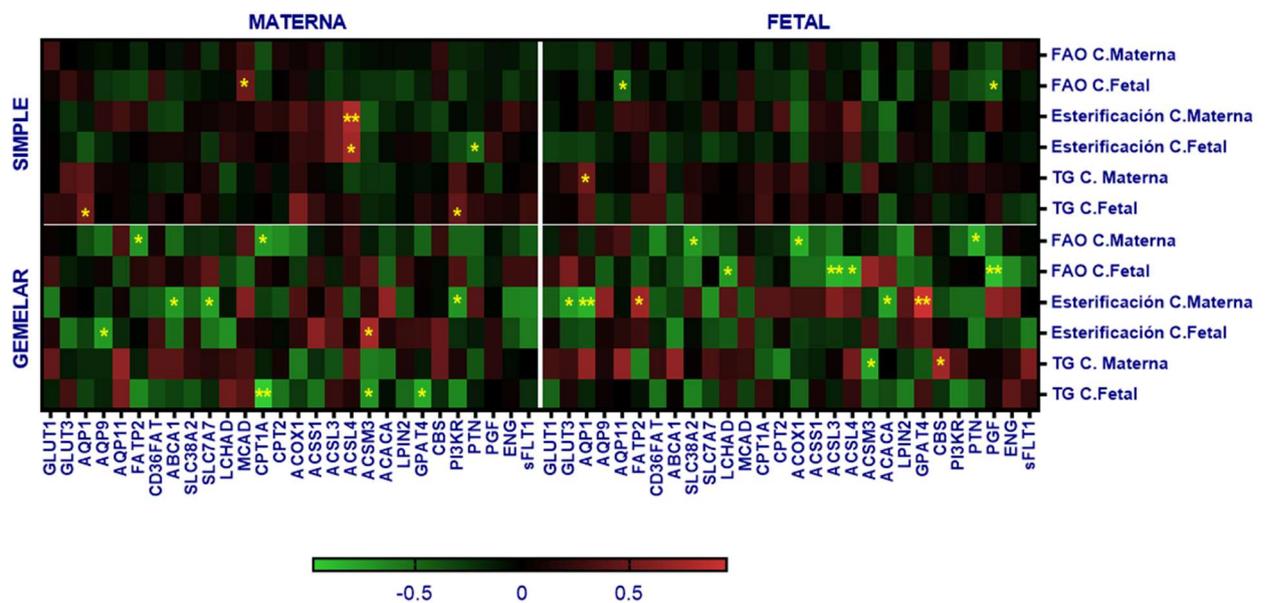


Figura 29. Mapa de calor en el que se representa la correlación entre los niveles de expresión génica de los distintos genes estudiados y los parámetros metabólicos en placentas procedentes de gestaciones no patológicas. El gráfico muestra el coeficiente de correlación de *Spearman* (S_p) entre variables. Las correlaciones estadísticamente significativas se muestran como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$.

Si analizamos por cuadrantes, podemos ver como en las placentas simples la expresión de acuaporina 1 en la cara materna correlaciona positivamente con el acúmulo de triglicéridos en la cara fetal, mientras que la expresión de AQP1 en la cara fetal correlaciona positivamente con el acúmulo de triglicéridos en la cara materna. Curiosamente el acúmulo de triglicéridos en un lado de la placenta está asociado a la expresión del transportador en el otro. Con respecto al resto de transportadores de nutrientes, además de las asociaciones ya mencionadas, solo se observa la correlación de la expresión de AQP11 en la cara fetal de las placentas, con la oxidación de ácidos grasos en esta misma cara.

En relación con las enzimas que participan en el metabolismo lipídico, la expresión de ACSL4 en la cara materna de las placentas parece estar estrechamente relacionada con la esterificación de triglicéridos, tanto en la cara materna como en la cara fetal. Por su parte la expresión de la PI3K, proteína involucrada en distintas vías de señalización, correlaciona positivamente en la cara materna de la placenta

con el acumulo de triglicéridos en la cara fetal. Por último, observamos la correlación negativa entre la expresión del PGF y la oxidación de ácidos grasos, ambos, en la cara fetal de las placentas.

Analizando la correlación en las distintas caras de las placentas gemelares, observamos como en la cara materna de las placentas correlaciona negativamente la expresión de *FATP2* y de *CPT1A* con la oxidación de ácidos grasos en esa misma cara. Por su parte la expresión de algunas proteínas en la cara fetal de estas placentas también correlaciona con la β oxidación de los ácidos grasos. La expresión de *SLC38A*, *ACOX1* y *PTN* correlaciona negativamente con la FAO en la cara materna de las placentas. Mientras que la expresión de otras proteínas en la cara fetal presenta una correlación negativa con la FAO en la cara fetal como es el caso de *LCHAD*, *ACSL3*, *ACSL4* y *PGF*. Por su parte la expresión de *ABCA1*, *SLC7A7* y *PI3K* en la cara materna de las placentas correlaciona negativamente con la esterificación de triglicéridos en esta misma cara. La expresión en la cara materna de *AQP9* y de *ACSM3* correlacionan con la esterificación en la cara fetal de las placentas. En relación con la expresión en la cara fetal de las placentas se han encontrado únicamente asociaciones con la esterificación en la cara materna. De forma que, existe una correlación negativa entre la expresión en la cara fetal de *GLUT3*, *AQP1* y *ACACA* y la esterificación en la cara materna, y una correlación positiva entre la expresión en la cara fetal de *FATP2* y *GPAT4* y la esterificación en la cara materna. Por último, la expresión en la cara materna de *CPT1A*, *ACSM3*, y *GPAT4* correlaciona con el acúmulo de triglicéridos en la cara materna, y la expresión de *ACSM3* y *CBS* en la cara fetal de las placentas correlaciona con el acúmulo de triglicéridos en la cara materna. Es curioso como el almacén de triglicéridos en una de las caras de la placenta se asocia con la expresión de proteínas en la otra cara en todos los casos.

Comparando las correlaciones que se producen en la cara materna de las placentas simples y gemelares, vemos que los patrones de correlación no son parecidos, parecen más bien ser asociaciones aisladas. En la cara fetal, comparando placentas de gestaciones gemelares frente a placentas de gestaciones simples, podemos ver como la fuerte correlación que parece que presentan la expresión de algunas enzimas y la oxidación de ácidos grasos en la cara fetal o la esterificación en la cara materna en las gestaciones gemelares, no aparece en las placentas simples. En cualquier caso y como comentamos al inicio, existe mayor número de correlaciones en las placentas gemelares que en las simples.

Aunque el estudio de correlación se realizó con todas las proteínas incluidas en el análisis, para facilitar la comprensión de los mismos, se comentan con detalle sólo las correlaciones con las proteínas cuyo nivel de mRNA ha mostrado diferencias estadísticamente significativas entre la cara fetal de las placentas procedentes de gestaciones simples y gestaciones gemelares, es decir, *GLUT1*, *CBS*, *PI3K* y *LPIN2*.

Como se pueden ver en la **Figura 30**, los resultados obtenidos en el estudio de correlación muestran un mayor número de correlaciones significativas en las placentas de gestaciones gemelares respecto de las sencillas, sobre todo en relación con los parámetros clínicos. Si comparamos la **cara materna y fetal de las gestaciones sencillas** vemos que únicamente correlaciona la expresión de algunos genes con factores circulantes maternos como PIGF, sFlt1 y el péptido C. El transportador de glucosa GLUT1 y LPIN2 correlacionan positivamente en la cara materna de las placentas con los niveles maternos de sFlt1, no observándose esta correlación en la cara fetal. Sin embargo, la expresión de GLUT1 en la cara fetal de las placentas correlaciona negativamente con los niveles de PGF, pero no así en la cara materna.

En relación con los parámetros metabólicos de la placenta, la expresión de PI3K en la cara materna de las placentas simples correlaciona positivamente con el acúmulo de triglicéridos en la cara fetal de las placentas, mientras que en las placentas gemelares correlaciona negativamente con la esterificación de triglicéridos en esta misma cara de la placenta.

Si comparamos la **cara materna y fetal de las gestaciones gemelares**, observamos que en la cara materna existe una asociación muy similar en la expresión de GLUT1, LPIN2 y CBS con los parámetros clínicos estudiados. Sin embargo, la expresión de PI3K parece tener un comportamiento diferente, correlacionando inversamente con otros parámetros. Algunas de estas asociaciones en GLUT1 y en PI3K se mantienen también en la cara fetal.

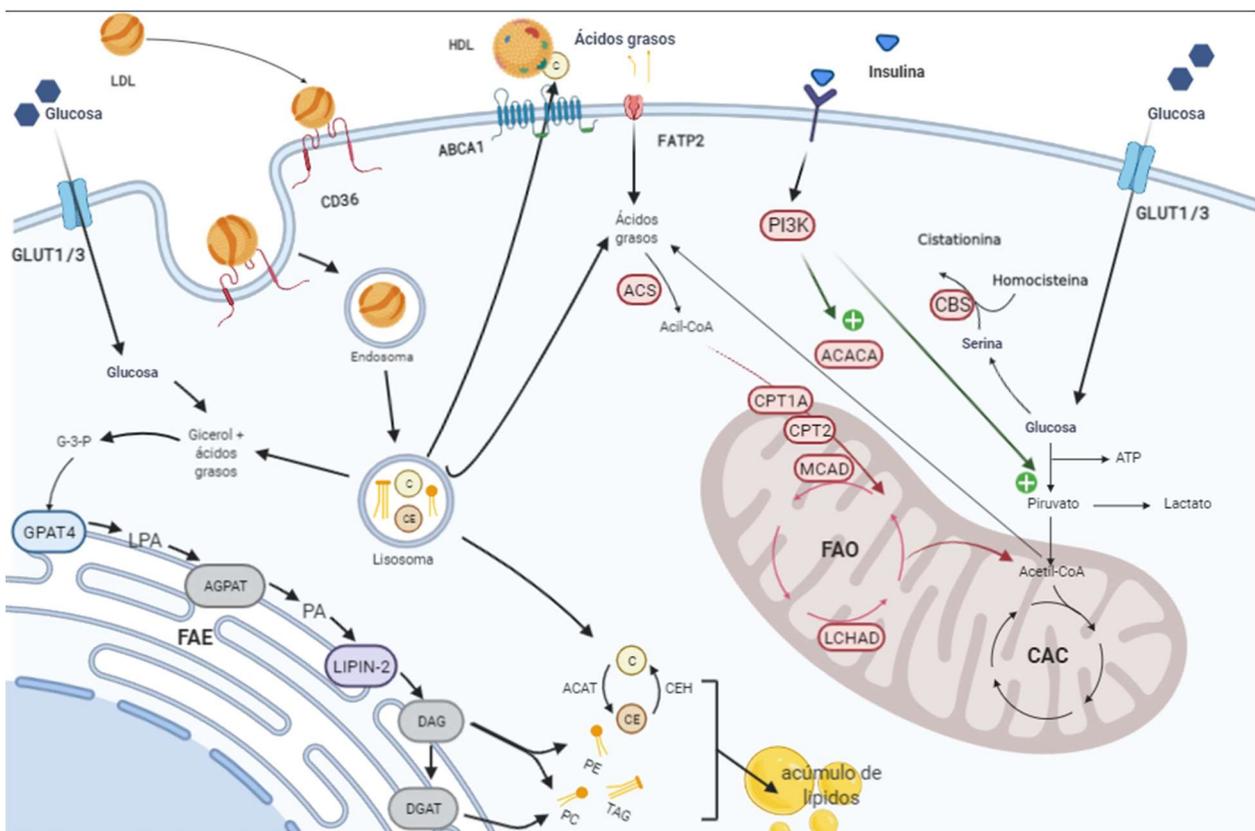


Ilustración 1. Esquema de las principales proteínas analizadas en el estudio.

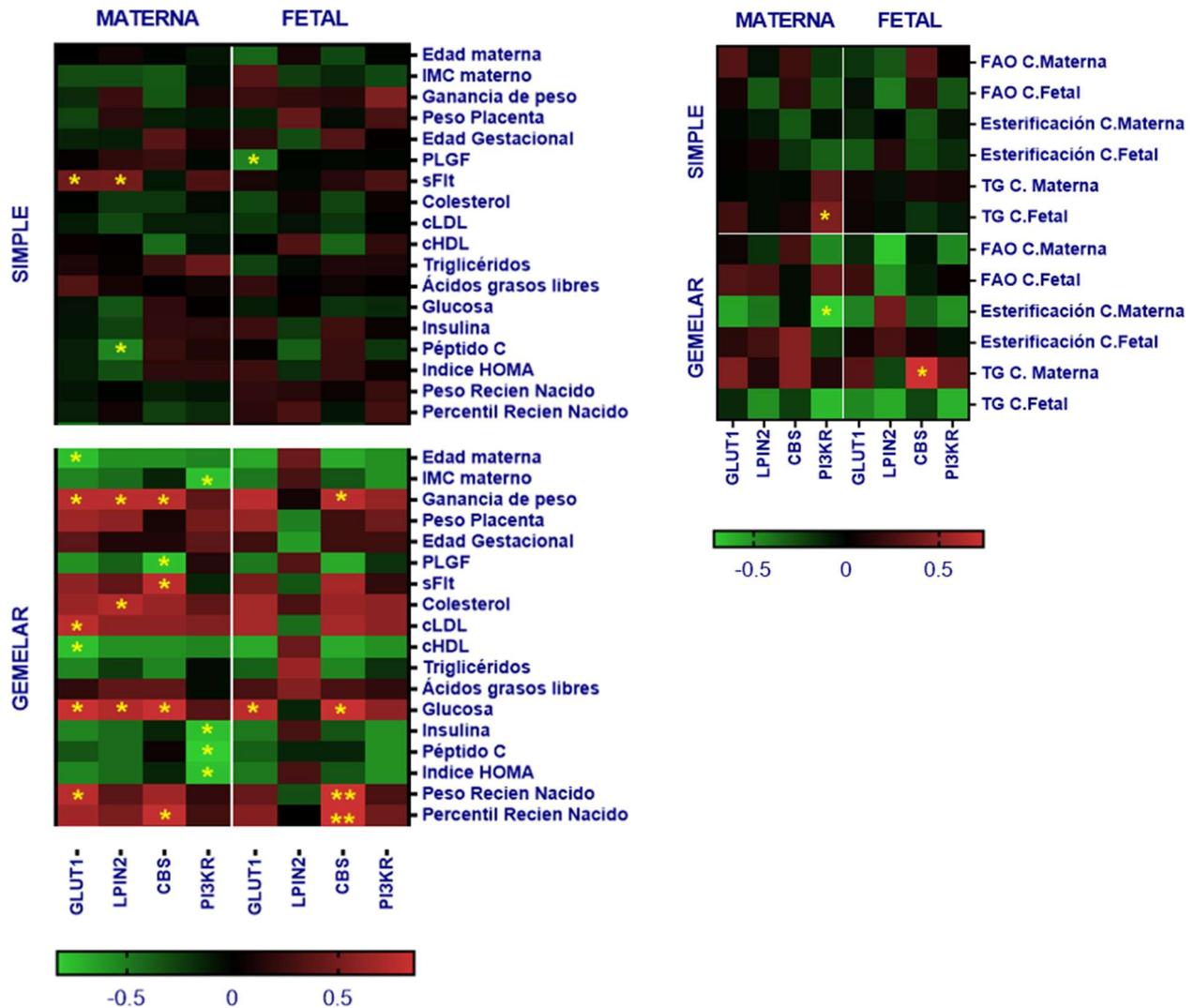


Figura 30. Heat-map en el que se representa la correlación entre los niveles de mRNA GLUT1, LPIN2, CBS y PI3K en placentas procedentes de gestaciones no patológicas y los parámetros clínicos maternos, fetales, obstétricos y metabólicos de la placenta. El gráfico muestra el coeficiente de correlación de Spearman (Sp) entre variables. Las correlaciones estadísticamente significativas se muestran como * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. Los parámetros incluidos fueron: edad materna (años), IMC materno pregestacional (Kg/m^2), ganancia de peso de la mujer durante la gestación (Kg), peso de la placenta (g), edad gestacional (semanas), PLGF (pg/ml), sFLT1 (pg/ml), colesterol total (mg/dl), colesterol asociado a LDL (cLDL, mg/dl), colesterol asociado a HDL (cHDL, mg/dl), ácidos grasos libres (mmol/L), glucosa (mg/dl), insulina ($\mu\text{U}/\text{mL}$), péptido C (ng/mL), índice HOMA, peso del recién nacido (g), percentil del recién nacido.

Así, en las gestaciones gemelares en la cara materna, la expresión de GLUT1, LPIN2 y CBS correlacionan positivamente con la ganancia de peso de la gestante y con los niveles de glucosa, y GLUT1 y CBS también se asocian positivamente con el peso y tamaño del recién nacido, respectivamente. En la cara fetal la asociación positiva con la ganancia de peso se mantiene en GLUT1 y CBS, sólo fue significativa en ésta última proteína, mientras que la correlación positiva con la glucemia fue significativa en ambas, de forma similar a lo observado en la cara materna. Por su parte la expresión de PI3K tiene una clara asociación con los niveles circulantes de glucosa e insulina maternos que en ambos casos correlaciona negativamente en la cara materna, pero no en la fetal. En este caso en relación con los parámetros

metabólicos de la placenta, la expresión de CBS en la cara fetal de las placentas gemelares correlaciona positivamente con el acúmulo de triglicéridos en la cara materna, no observándose ninguna otra correlación. Por su parte la expresión de PI3K en la cara materna de las placentas correlaciona negativamente con la esterificación de triglicéridos en esta misma cara de la placenta.

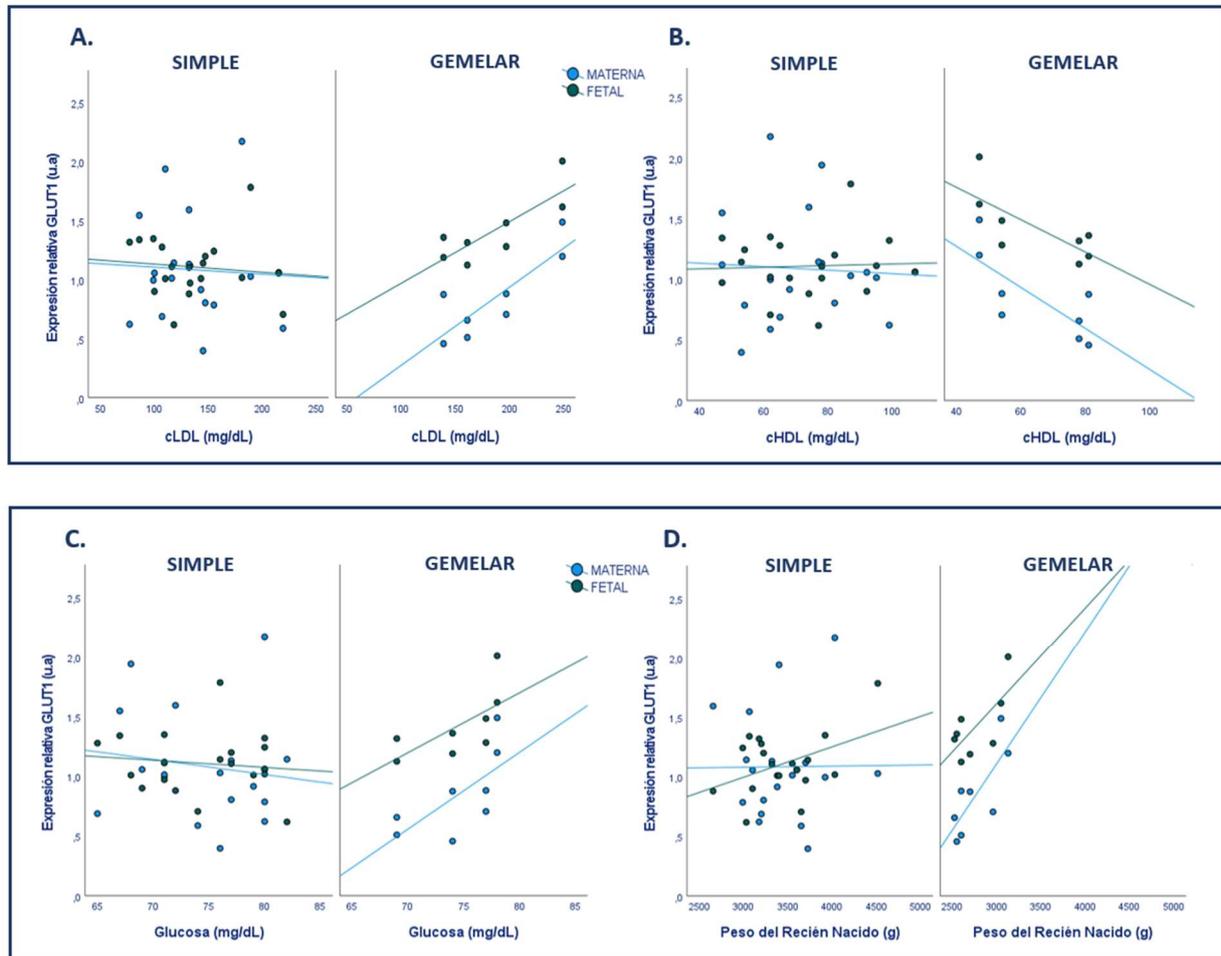


Figura 31. Gráficos de correlación del nivel de mRNA de GLUT1 en la placenta con los niveles circulantes en la madre de colesterol asociado a LDL (A), HDL (B), la glucemia (C), y el peso del recién nacido (D). La línea azul clara muestra la tendencia en la cara materna de la placenta y la línea oscura muestra la tendencia en la cara fetal.

A: placenta gemelar cara materna, correlación GLUT1 y cLDL ($S_p = 0.781$; $p=0.022$)

B: placenta gemelar cara materna, correlación GLUT1 y cHDL ($S_p = -0.781$; $p=0.022$)

C: placenta gemelar cara materna, correlación GLUT1 y glucosa materna ($S_p = 0.830$; $p=0.011$)

C: placenta gemelar cara fetal, correlación GLUT1 y glucosa materna ($S_p = 0.781$; $p=0.022$)

D: placenta gemelar cara materna, correlación GLUT1 y peso del recién nacido ($S_p = -0.766$; $p=0.027$)

Como se ha comentado, **GLUT1** fue una de las proteínas que mostró mayores diferencias en las correlaciones entre gestaciones sencillas y gemelares. Así, además de las correlaciones comentadas, se observa que en la cara materna de las placentas gemelares el mRNA de GLUT1 correlaciona negativamente con la edad de la gestante, con los niveles de cHDL, y positivamente con los niveles de cLDL. Estos resultados de las correlaciones de GLUT1 se muestran con más detalle en la **Figura 31**. En esta

en la **Figura 30**, se puede ver perfectamente como en la cara fetal (representado en verde) de las placentas gemelares, los niveles mRNA de GLUT1 son mayores respecto a la cara fetal (representado en azul). Además, es evidente que existe una asociación entre los niveles de mRNA de GLUT 1 y los niveles de colesterol asociado a LDL y HDL que solo se produce en las placentas de gestaciones gemelares. En las gestaciones gemelares, parece que el suministro de nutrientes por parte de la madre se asocia con el nivel de mRNA de GLUT1 en la placenta, como se puede ver en la **Figura 31 A y C**. También es interesante destacar la asociación del transportador con el peso del recién nacido en las gestaciones gemelares.

Los transportadores de glucosa seleccionados para el estudio fueron GLUT1 y GLUT3, dado que, según las bases de datos, son los transportadores con mayor expresión en placenta humana. En la placenta de tercer trimestre la expresión de GLUT1 es mayor que la de GLUT3 ([Langdown & Sugden, 2001](#)). Por lo que el transporte de glucosa en este momento de la gestación esta mediado fundamentalmente por este transportador. Nuestros resultados del nivel de expresión génica de GLUT1, reflejan un aumento en la cara fetal de las placentas gemelares.

Algunos estudios apuntan a que la fecundación *in vitro* afecta a la expresión de los transportadores GLUT ([Dong et al., 2019](#)). En nuestro estudio todos los gemelos proceden de fecundación *in-vitro*, por lo que puede ser que esta variación en la expresión de los transportadores en gestaciones gemelares pueda estar influenciada en este sentido. Para poder descartar que se deba a este factor debería considerarse la posibilidad de realizar el estudio en gestaciones gemelares que no procedan de fecundación *in-vitro*.

En todo caso llama la atención que esta diferencia se observa únicamente en la cara fetal con respecto a la cara materna de las placentas. En el estudio de Castillo-Castrejon, M. y colaboradores en 2021 observaron como en gestaciones de mujeres diabéticas se producía un aumento de la expresión del transportador de GLUT1 en la membrana basal de la placenta junto con otros transportadores de nutrientes, llegando a la conclusión de que puede ser éste uno de los motivos que contribuye al aumento de peso de los recién nacidos ([Castillo-Castrejon et al., 2021](#)). En este sentido, es posible que el mayor suministro de nutrientes en las mujeres con gestaciones gemelares vaya en línea con lo que podría estar ocurriendo en una mujer diabética, en la que la mayor expresión de transportadores en la placenta favorezca el mayor aporte de glucosa al feto. De hecho, hemos observado, tanto en la cara materna como en la cara fetal de las placentas de partos gemelares, una correlación positiva entre los niveles de glucosa circulante en la madre y la expresión del transportador. Por otra parte, también hemos encontrado una correlación de la expresión del transportador de glucosa en la cara materna de las placentas gemelares con el aumento de peso del recién nacido. En un estudio reciente, realizado en mujeres diabéticas de tipo 1, se ha propuesto que el aumento de GLUT1 en la membrana basal de las placentas contribuye al aumento de peso del recién nacido ([Joshi et al., 2021](#)).

También se ha descrito que, a diferencia de los estudios anteriores en diabetes, la obesidad materna se relaciona con una menor expresión de GLUT1 en la placenta (Nogues et al., 2021). Esto podría indicar que, aunque haya mayor disponibilidad de nutrientes, la placenta es capaz de modular la presencia de transportadores, y de esa forma proteger al feto de un excesivo aporte energético. En el caso de las gestaciones gemelares, al tratarse de dos fetos la demanda energética es mayor, por lo que se favorecería una mayor disponibilidad de glucosa con la consiguiente ganancia de peso del bebé. Este aumento de nutrientes podría estar también asociado con el aumento observado en la expresión de las enzimas del metabolismo CBS, LPIN2 y PI3K en la cara fetal de las placentas gemelares. En el caso de CBS, queda patente en la correlación positiva que presenta su expresión tanto con la ganancia de peso materna, la glucosa circulante y el peso del recién nacido.

En cuanto a la **lipina**, aparte de las correlaciones mencionadas más arriba (en la cara materna de las placentas de gestaciones sencillas correlaciona positivamente con los niveles de sFLT1 circulantes y negativamente con el péptido C, no habiendo correlación en la cara fetal de las mismas placentas) en la cara materna de las gestaciones gemelares el mRNA se correlaciona positivamente con la ganancia de peso, y los niveles circulantes de colesterol y de glucosa (**Figura 32.A**), no observándose tampoco ninguna correlación en la cara fetal. Tampoco hemos encontrado ninguna asociación entre la lipina con los parámetros metabólicos estudiados en la placenta.

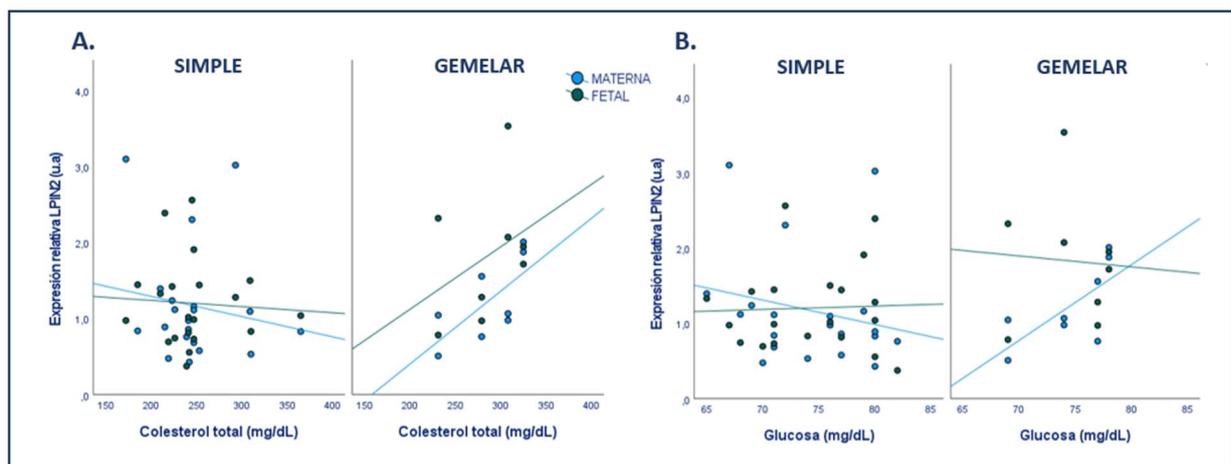


Figura 32. Correlación entre el nivel de mRNA de LPIN2 en la placenta con los niveles circulantes maternos de colesterol total (A), y la glucosa (B), en partos sencillos y partos gemelares. La línea azul clara muestra la tendencia en la cara materna de la placenta y la línea oscura muestra la tendencia en la cara fetal.

A: placenta gemelar cara materna, correlación LPIN2 y el colesterol total materno ($S\rho = 0.732$; $p=0.039$)

B: placenta gemelar cara materna, correlación LPIN2 y la glucemia materna ($S\rho = -0.7321$; $p=0.039$)

A la luz de estos resultados parece que la expresión de LPIN2, comparte una tendencia similar a la de GLUT1 y CBS en la placenta de tercer trimestre, es decir, una mayor expresión en la cara fetal de la placenta gemelar, que podría estar relacionada con la ganancia de peso y la disponibilidad de glucosa. En humanos, podemos encontrar 3 isoformas de lipina. Esta enzima con actividad fosfatidato fosfatasa (PAP)

participa en el metabolismo de lípidos y en la regulación de genes involucrados en el metabolismo lipídico. ([Y. Chen, Rui, Tang, & Hu, 2015](#); [Harris & Finck, 2011](#)). La isoforma 1 es la más estudiada en términos generales, sin embargo, no hay muchos estudios sobre la actividad de lipina 2, y aún menos en la placenta. Sin embargo, en nuestro estudio analizamos únicamente la expresión de *LPIN2*, ya que se trata de la isoforma mayoritaria en la placenta. Algunos artículos describen su papel en la regulación de la expresión de genes proinflamatorios y el almacenamiento de triglicéridos en macrófagos humanos, en los que se observa como Lipina 2 reduce la señalización proinflamatoria generada por los ácidos grasos promoviendo la síntesis de TG ([Valdearcos et al., 2012](#); [Watahiki et al., 2020](#)). En 2007, fruto de un estudio basado en un análisis de polimorfismos en este gen, se asoció a la lipina 2 con el metabolismo de la glucosa y la composición corporal y diabetes tipo 2. ([Aulchenko et al., 2007](#)). Esta asociación va en la línea con lo que hemos observado en la expresión de GLUT 1, además de que también presenta la expresión de *LPIN2* en la cara materna de las placentas gemelares una correlación positiva con la ganancia de peso y glucosa.

Es de destacar que el mRNA de **CBS** no presenta correlación con los parámetros estudiados en las placentas simples, pero en las placentas gemelares correlaciona positivamente con la ganancia de peso y la glucemia materna (**Figura 33 A**), tanto en la cara materna como en la cara fetal. Además, en ambas caras de las placentas se observa una relación negativa entre la expresión de CBS y los niveles de PGF y positiva con sFLT como se puede observar en la **Figura 33 C y D**, que solo es estadísticamente significativa en la cara materna. Además, en las placentas gemelares, la expresión de CBS correlaciona positivamente con el tamaño y el peso del recién nacido (**Figura 32 B**). que no se observa en las placentas simples. En cualquier caso, en estos gráficos se puede corroborar como la expresión de CBS en la cara fetal de las placentas gemelares es mayor que en la cara materna. Estudios previos han localizado la expresión de CBS en el endotelio fetal de la placenta. Esta enzima cataliza la síntesis de cistationina a partir de homocisteína, formando parte de la vía de transulfuración, por lo que está estrechamente relacionada con el metabolismo de un carbono y el metabolismo del ácido fólico.

Es por ello que su expresión se ve regulada en muchos casos por los niveles de homocisteína, la concentración de folatos o los niveles de vitamina D. Además, la CBS junto con la cistationina gamma liasa (CSE) catalizan la síntesis de ácido sulfhídrico (H₂S) a partir de L-cisteína ácido que tiene propiedades vasodilatadoras, antioxidantes y angiogénicas entre otras ([Cindrova-Davies et al., 2013](#); [Holwerda et al., 2012](#); [Nandi, Wadhvani, & Joshi, 2017](#); [Nandi et al., 2021](#); [Solanky, Requena Jimenez, D'Souza, Sibley, & Glazier, 2010](#); [Sonne et al., 2013](#)). De hecho, La CBS en las placentas se ha relacionado con los niveles de homocisteína ([Sonne et al., 2013](#)) y de H₂S ([B. Wang et al., 2020](#)).

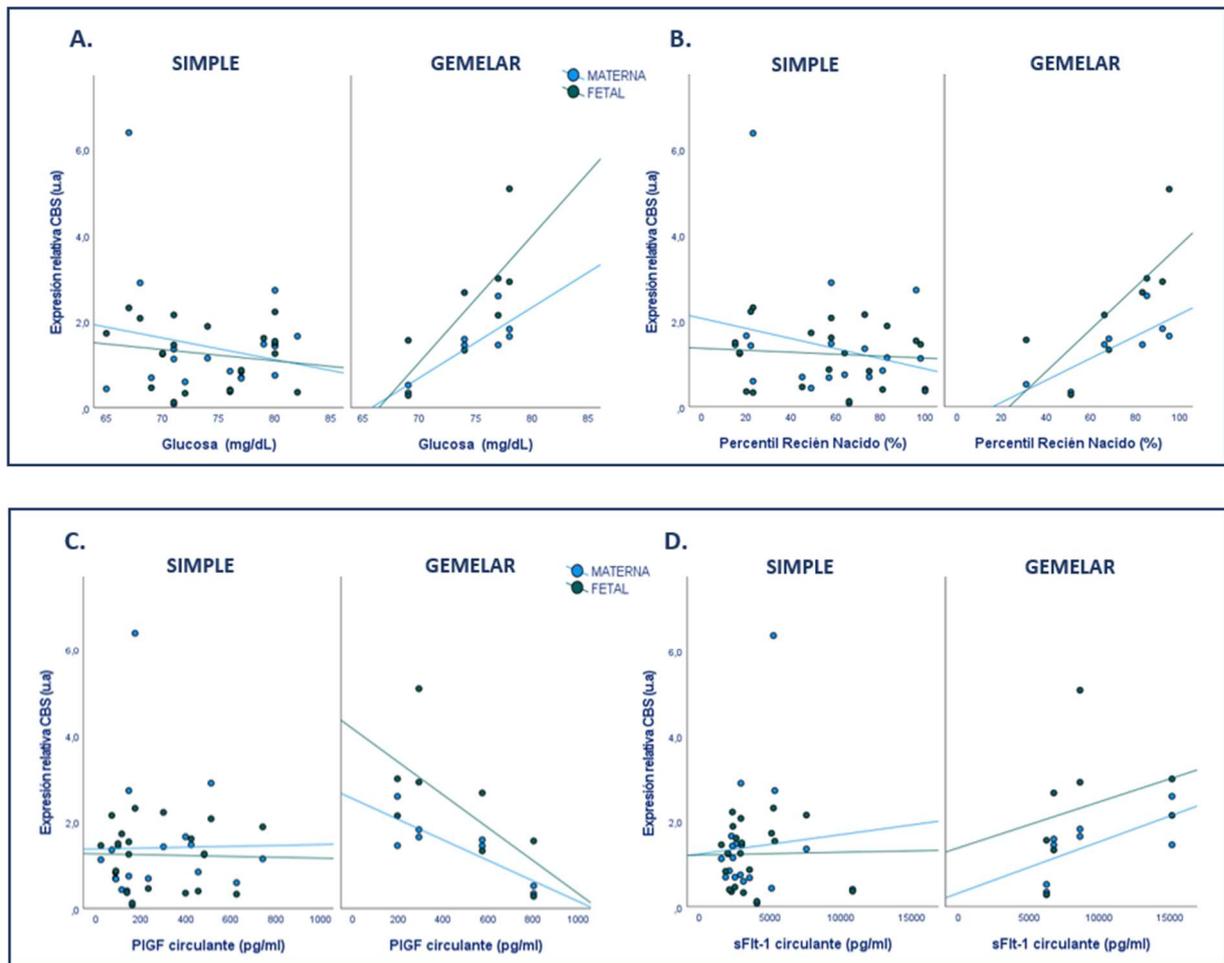


Figura 33. Correlación entre el nivel de mRNA de CBS en la placenta con los niveles circulantes maternos de glucosa total (A), y el percentil del recién nacido (B), los niveles circulantes maternos de sFlt-1 (C) y PIGF (D), en partos sencillos y partos gemelares. La línea azul clara muestra la tendencia en la cara materna de la placenta y la línea oscura muestra la tendencia en la cara fetal.

A: placenta gemelar cara materna, correlación CBS y glucemia materna ($S\rho = 0.830$; $p=0.011$)

A: placenta gemelar cara fetal, correlación CBS y glucemia materna ($S\rho = 0.830$; $p=0.011$)

B: placenta gemelar cara materna, correlación CBS y percentil del recién nacido ($S\rho = -0.810$; $p=0.015$)

B: placenta gemelar cara fetal, correlación CBS y percentil del recién nacido ($S\rho = -0.857$; $p=0.007$)

C: placenta gemelar cara materna, correlación CBS y sFlt-1 ($S\rho = -0.781$; $p=0.022$)

D: placenta gemelar cara materna, correlación CBS y PIGF ($S\rho = 0.781$; $p=0.022$)

Se ha descrito que, por una parte, H_2S inhibe la liberación de sFLT1 en la placenta y que, por otra parte, cuando se produce una disminución de H_2S en la placenta aumenta la producción de sFLT1. Es por ello que se ha relacionado H_2S con la preeclampsia en la que se produce un aumento de sFLT1 (T. Hu et al., 2015; T. X. Hu et al., 2016; Mohanraj, Rahat, Mahajan, Bagga, & Kaur, 2019). En este sentido, hemos encontrado que hay una correlación entre la expresión de CBS en la cara materna de las gestaciones gemelares y los niveles circulantes maternos de factores angiogénico como sFLT1 y PGF. La expresión de esta enzima correlaciona positivamente con sFLT1 (factor antiangiogénico) y negativamente con PGF (factor proangiogénico). Parece, por tanto, que en la gestación gemelar la expresión de la enzima en la

placenta podría estar modulada por estos factores para mantener un correcto equilibrio en la vía de la transulfuración.

Además de los anteriores se han descrito en la bibliografía otros factores que regulan la expresión de CBS en la placenta. Así, se ha visto que la expresión de la enzima está regulada a la baja en mujeres fumadoras (S. P. Singh et al., 2020), y también se ha relacionado con el peso del recién nacido (Kjaergaard et al., 2022). Precisamente, en nuestro estudio, hemos observado que en las gestaciones gemelares hay una correlación positiva entre el peso y tamaño del recién nacido y los niveles de expresión de CBS en la cara fetal de la placenta que no encontramos en el caso de las placentas de las gestaciones simples.

Finalmente, aunque no hemos observado que del mRNA de PI3K en las placentas de gestaciones simples correlacione con ninguno de los parámetros estudiados, si se asocia con diversos parámetros en las gestaciones gemelares. Así, PI3K correlaciona negativamente, en la cara materna, con el IMC materno al inicio de la gestación y con los niveles circulantes de insulina, péptido C y con el índice HOMA (Figura 26 y Figura 33). En la cara fetal, aunque se observa la misma tendencia en estas asociaciones no llegan a ser estadísticamente significativas (Figura 26).

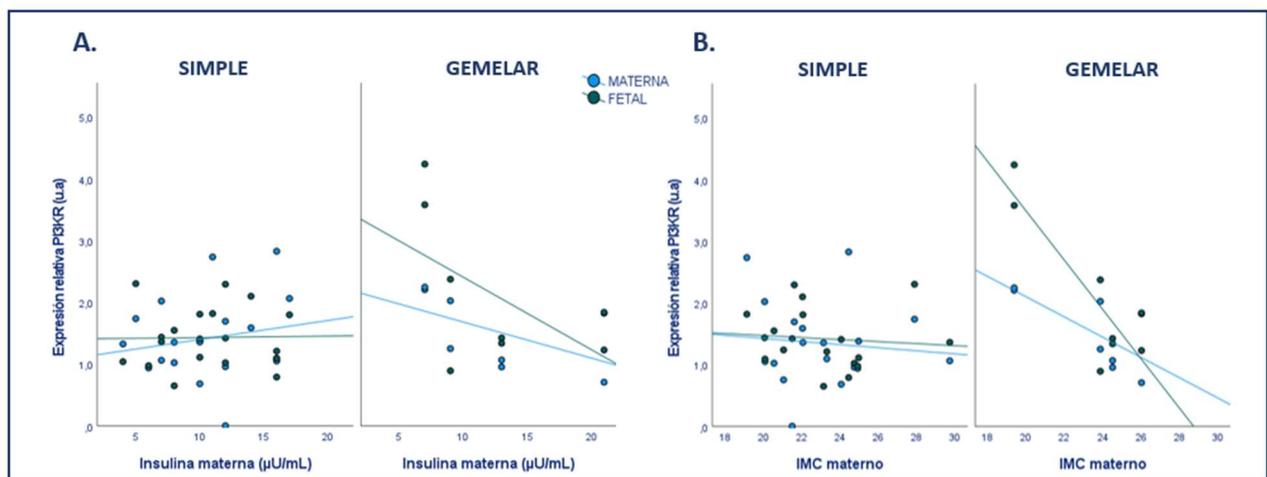


Figura 34. Correlación entre el nivel de mRNA de PI3KR en la placenta con los niveles de insulina materna (A), y el IMC materno al inicio de la gestación (B) en partos sencillos y partos gemelares. La línea azul clara muestra la tendencia en la cara materna de la placenta y la línea oscura muestra la tendencia en la cara fetal.

A: placenta gemelar cara materna, correlación de PI3K e insulina materna ($S\rho = -0.781$; $p=0.022$)

B: placenta gemelar cara materna, correlación PI3K y IMC materno previo a la gestación ($S\rho = -0.781$; $p=0.022$)

La fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K), cataliza la fosforilación del fosfatidil inositol a fosfatidilinositol inositol trifosfato siendo una enzima clave en distintas rutas de señalización. Está formada por una subunidad catalítica de 110 kDa PI3KCA, y una subunidad reguladora de 85 kDa, PI3KR (Chu et al., 2021; Stephens, Eguinoa, Corey, Jackson, & Hawkins, 1993). La señalización mediada por PI3K modula el sistema inmunitario durante la gestación, el metabolismo lipídico y glucídico, y se ha relacionado con la modulación de actividad frente al estrés oxidativo. Entre otras vías de señalización, PI3K participa en la señalización de la insulina, la principal hormona anabólica y anticatabólica del

organismo. Así, el suministro de nutrientes de la madre al feto está regulado por vías de señalización en las que participa PI3K ([Lien et al., 2021](#)), y la disponibilidad de nutrientes maternos en el lado fetal está directamente relacionado con el tamaño del recién nacido ([Merech et al., 2019](#)). Algunos trabajos sugieren una relación entre el aumento de la expresión de PI3K en la placenta en las mujeres con diabetes gestacional y el peso del recién nacido ([Balachandiran et al., 2021](#)). Aunque en la cohorte de mujeres con gestación gemelar no hay diferencias estadísticamente significativas en la insulina, péptido C e índice HOMA respecto a la gestación sencilla, no podemos descartar que la evolución circadiana de insulina sea diferente al estar estas madres sometidas a un gasto energético mucho mayor. Por ello, dada la correlación inversa que hemos observado en la cara materna en las gestaciones gemelares no solo con la insulinemia materna sino también con el péptido C y el índice HOMA, se podría sugerir que en la placenta se modula la expresión de PI3K en la cara materna como mecanismo de protección ante las oscilaciones en la insulina para proteger al feto de un alterado crecimiento fetal. De hecho, en las placentas gemelares el acúmulo de triglicéridos en la cara materna es prácticamente inexistente mientras que en la cara fetal es mucho mayor, como se puede ver en la **Figura 34 A y C**, tal y como hemos descrito recientemente ([Abascal-Saiz et al., 2021](#)).

En los últimos años, la edad de las madres gestantes es cada vez mayor, lo que está provocando un aumento de la utilización de técnicas de reproducción asistida como la fecundación *in vitro* (FIV), la cual se asocia con una mayor frecuencia de embarazos múltiples ([Suder, Gniadek, Micek, & Pawlik, 2021](#)). Como consecuencia, está aumentando la prevalencia de embarazos múltiples en la población. En España en el año 2020 el 1,6% de partos eran dobles, en 1999 en número de partos dobles era del 1,4% según datos del Instituto Nacional de Estadística (INE). En los embarazos múltiples hay mayor riesgo de sufrir complicaciones obstétricas y otras patologías, tales como la restricción del crecimiento intrauterino (RCIU), la preeclampsia o la diabetes mellitus gestacional (DMG) entre otras ([De la Calle, Bartha, García, Cuerva, & Ramiro-Cortijo, 2021](#); [Y. Wang, Shi, et al., 2021](#)).

Se ha descrito también como la expresión de *PI3K* en la placenta puede verse alterada en las placentas que proceden de tratamientos de fecundación *in vitro*, ya que afectan al desarrollo de la placenta y es por ello que en muchos casos se puede encontrar alterado el transcriptoma de esta ([S. Yang et al., 2021](#)). Estudios previos han descrito que las placentas procedentes de fecundación *in vitro* presentan diferencias en el transcriptoma en comparación con las placentas procedentes de fecundación natural ([L. Zhao, L. Sun, et al., 2020](#); [L. Zhao et al., 2019](#)). Por tanto, como se ha comentado anteriormente, para poder confirmar estos estudios sería necesario validar estos resultados en gestaciones gemelares que no provengan de fecundación *in vitro*.

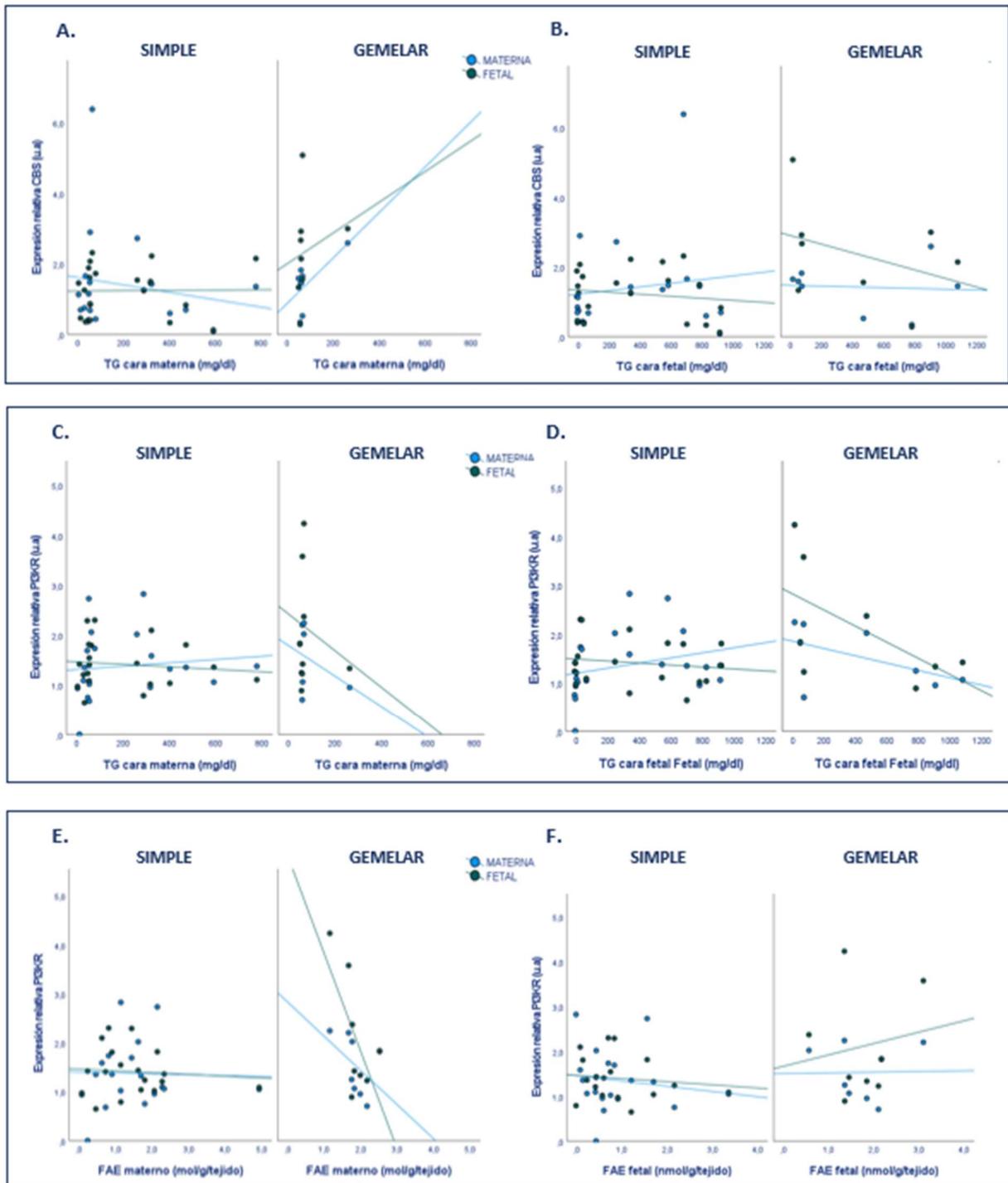


Figura 35. Correlación entre el acúmulo de TG en las distintas caras de la placenta con el nivel de mRNA de PI3K en la placenta con los niveles de insulina materna (A), y el IMC materno al inicio de la gestación (B) en partos sencillos y partos gemelares. La línea azul clara muestra la tendencia en la cara materna de la placenta y la línea oscura muestra la tendencia en la cara fetal.

A: placenta gemelar cara fetal, correlación CBS y TG cara materna ($S_p = 0.738$; $p=0.037$)

B: No existe correlación de CBS y TG cara fetal en estas placentas

C: No existe correlación de PI3K y TG cara materna en estas placentas

D: placenta simple cara materna, correlación PI3K y TG cara fetal ($S_p = 0.447$; $p=0.048$)

E: placenta gemelar cara materna, correlación PI3K y FAE cara materna ($S_p = -0.714$; $p=0.047$)

F: No existe correlación de PI3K y FAE cara fetal en estas placentas.

El grupo de gestantes con embarazos gemelares que han participado en el estudio procede en todos los casos de fecundación *in vitro*. Todas ellas presentan una mayor ganancia de peso y mayores niveles de LDL-colesterol y triglicéridos circulantes, por lo que el suministro de nutrientes en las gestaciones gemelares es mayor que en las sencillas. Como es habitual en este tipo de gestaciones la edad gestacional a término es más baja que en las gestaciones sencillas y por consiguiente el peso del recién nacido y de la placenta también son significativamente inferiores. En estudios previos realizados en colaboración con el grupo del Dr. Jose Luis Bartha, se ha identificado en la cara fetal de las placentas gemelares una mayor esterificación de triglicéridos y un mayor acúmulo de los mismos, que va en consonancia con nuestro estudio de expresión génica en las mismas placentas. Así, hemos encontrado un aumento en la expresión de las proteínas GLUT1, CBS, LPIN2 y PI3K en la cara fetal de las placentas gemelares en relación con las sencillas.

Como hemos comentado anteriormente las placentas procedentes de fecundación *in vitro* presentan diferencias en el transcriptoma en comparación con las placentas procedentes de fecundación natural. En el caso particular de GLUT1 y PI3K se ha descrito el aumento en la expresión en este tipo de placentas. Por otro lado, el perfil de expresión de las placentas estudiadas presenta similitudes en relación con las placentas procedentes de gestaciones con diabetes. Esto puede estar relacionado un mayor aporte de nutrientes por parte de la madre al feto, un aumento en la captación de los mismos y un aumentado metabolismo glucídico y lipídico de la placenta para favorecer el suministro de nutrientes al feto. Sin embargo, a diferencia de las gestaciones con diabetes, en las gestaciones gemelares pese a ser mayor el aporte de nutrientes madre feto, estos fetos no presentan un mayor peso. Esto es así probablemente ya que al haber dos fetos la demanda energética es mayor y la placenta se acomoda para aportar un suministro adecuado de nutrientes. Parece pues que los hallazgos encontrados en nuestro estudio sugieren que el aumento de las proteínas, GLUT1, lipina, CBS y PI3K en las placentas surge como una adaptación metabólica para permitir un aporte adecuado de nutrientes al feto.

Por tanto, las diferencias encontradas entre las placentas simples y las placentas gemelares son de algún modo diferencias que resultan del proceso de adaptación a los requerimientos para el desarrollo de los dos fetos. Si bien es verdad que, de forma novedosa, hemos observado como existe un comportamiento diferencial entre las caras de la placenta que se encuentra perfectamente coordinado y que permite acomodar los recursos maternos a la demanda energética fetal. Sin embargo, para confirmar que las diferencias obtenidas no son consecuencia de la FIV, sería importante poder realizar un estudio de confirmación en gestantes con embarazos gemelares que no procedan de FIV.

4.2.2 Estudio 2: Cambios en la expresión génica en la placenta de gestaciones complicadas con preeclampsia.

En este apartado se resumen los resultados obtenidos en el estudio de expresión génica en placenta, tanto en la cara materna como en la cara fetal, de tercer trimestre de gestaciones sencillas complicadas con preeclampsia. En primer lugar, se muestran las características clínicas de las gestantes control y de las gestantes con preeclampsia de aparición temprana (PE) y de aparición tardía (PL). Tanto en las tablas como en las figuras se muestran los datos de todas las mujeres que sufrieron preeclampsia y a continuación se muestran separados en función del momento de aparición.

4.2.2.1 Características clínicas de las gestantes.

Los datos clínicos más relevantes se recogen en la **Tabla 20** y para una visualización más sencilla se describirán de forma gráfica aquellos parámetros que presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio (**Figura 36**). Como se puede observar, las mujeres con gestaciones complicadas con preeclampsia de aparición temprana presentan una disminución en la edad gestacional que no se observa en los casos de aparición tardía. Además, tanto el peso de la placenta como del recién nacido son menores en todos los casos de preeclampsia, siendo la disminución del peso más marcada en los casos de preeclampsia de aparición temprana. En cuanto a los parámetros bioquímicos maternos, también observamos diferencias en el perfil lipémico, así como en la insulina y el péptido C. En las gestantes con preeclampsia de aparición tardía los niveles circulantes de triglicéridos, insulina y péptido C son significativamente superiores con respecto al resto de los grupos. En el caso de los niveles de colesterol asociado a HDL son las gestantes con preeclampsia temprana las que presentan mayores niveles. Finalmente, los ácidos grasos libres parecen estar aumentados en todos los casos de preeclampsia, sin haber diferencias entre la forma temprana o tardía.

Tabla 20. Datos clínicos maternos, fetales y obstétricos de la cohorte de estudio

Parámetros (unidades)	Control (n= 20)	Preeclampsia (n=18)	Preeclampsia temprana -PE- (n=9)	Preeclampsia tardía-PL- (n=9)
Edad materna (años)	36,25 ± 4,54	33,89 ± 5,19	31,44 ± 6,31	36,33 ± 2,00
Ganancia de peso (kg)	12,78 ± 5,09	13,67 ± 7,65	9,50 ± 3,21	16,44 ± 8,62
IMCi (Kg/m ²)	23,07 ± 2,78	23,94 ± 3,49	22,74 ± 3,63	24,74 ± 3,36
Edad gestacional (semanas)	39,37 ± 0,90	34,28 ± 3,79	31,67 ± 3,61	36,89 ± 1,45
Colesterol (mg/dL)	246,45 ± 44,55	270,06 ± 45,32	267,38 ± 51,85	272,44 ± 41,74
Colesterol-LDL (mg/dL)	135,50 ± 40,00	148,94 ± 58,93	125,25 ± 63,54	170,00 ± 48,51
Colesterol-HDL (mg/dL)	73,05 ± 17,15	82,94 ± 18,84	90,88 ± 21,63	75,89 ± 13,48
Triglicéridos (mg/dL)	214,90 ± 73,08	264,12 ± 109,43	208,38 ± 59,79	313,67 ± 122,29
Ácidos grasos libres (mmol/L)	189,45 ± 239,12	226,79 ± 100,66	248,50 ± 129,87	210,50 ± 77,86
Glucosa (mg/dl)	74,25 ± 5,11	76,59 ± 13,98	78,50 ± 18,54	74,89 ± 9,12
Insulina (μU/mL)	10,58 ± 3,96	27,31 ± 45,86	39,00 ± 69,28	18,22 ± 11,41
Péptido C (ng/mL)	1,62 ± 0,48	2,84 ± 1,99	2,93 ± 2,60	2,77 ± 1,46
Índice HOMA-IR	1,95 ± 0,75	5,89 ± 11,48	8,89 ± 17,37	3,57 ± 2,64
Proteinuria 24h	-	2594,80 ± 3103,73	4440,67 ± 4259,36	1364,22 ± 1122,55
Peso placenta (g)	609,16 ± 148,03	368,25 ± 147,75	288,05 ± 111,50	448,45 ± 139,59
Peso recién nacido (g)	3418,75 ± 427,94	1913,12 ± 997,92	1204,75 ± 737,32	2542,78 ± 753,77
Percentil recién nacido	56,15 ± 28,54	20,53 ± 32,80	1,25 ± 1,91	37,67 ± 338,02

En la tabla se muestra la media y la desviación estándar de diversos parámetros de las mujeres y los recién nacidos en cada uno de los grupos estudiados de gestaciones no patológicas y gestaciones complicadas con preeclampsia. En las columnas 4 y 5 se ha subdividido el grupo de preeclampsia en función del momento de aparición, como temprana o tardía, respectivamente.

La preeclampsia surge a consecuencia de un defecto en el desarrollo de la placenta, en el que se produce una hipoperfusión sanguínea desencadenando un entorno de hipoxia. Esta situación supone una alteración en el desarrollo de la placenta que afecta entre otras cosas al su transcriptoma, produciéndose un desequilibrio en la producción y liberación de factores relacionados con la angiogénesis, así como un fallo endotelial ([Y. Liu et al., 2021](#)). A consecuencia de este defecto en la placentación, es posible que el feto sufra retraso en el crecimiento intrauterino ([Nirupama et al., 2021](#)). Algunos trabajos postulan que ese retraso puede deberse a la alteración en la expresión de transportadores de nutrientes, de manera que el suministro de la madre al feto se ve mermado, así como el propio suministro para el metabolismo de la placenta ([Lager & Powell, 2012](#)). El mecanismo subyacente a la regulación de la expresión génica de transportadores en placentas con preeclampsia aún no se ha descrito con claridad, sin embargo, se ha visto que tanto HIF-1 α como sFlt1, relacionados con hipoxia y angiogénesis respectivamente, participan en esta regulación ([Chun & Kim, 2021](#); [Vogtmann et al., 2019](#); [H. Zhao, Wong, & Stevenson, 2021](#)). Por ello, nos planteamos realizar un estudio de expresión génica en el que se analizó el mRNA de transportadores de nutrientes tanto en la cara fetal como en la cara materna de la placenta (**Ilustración 1**).

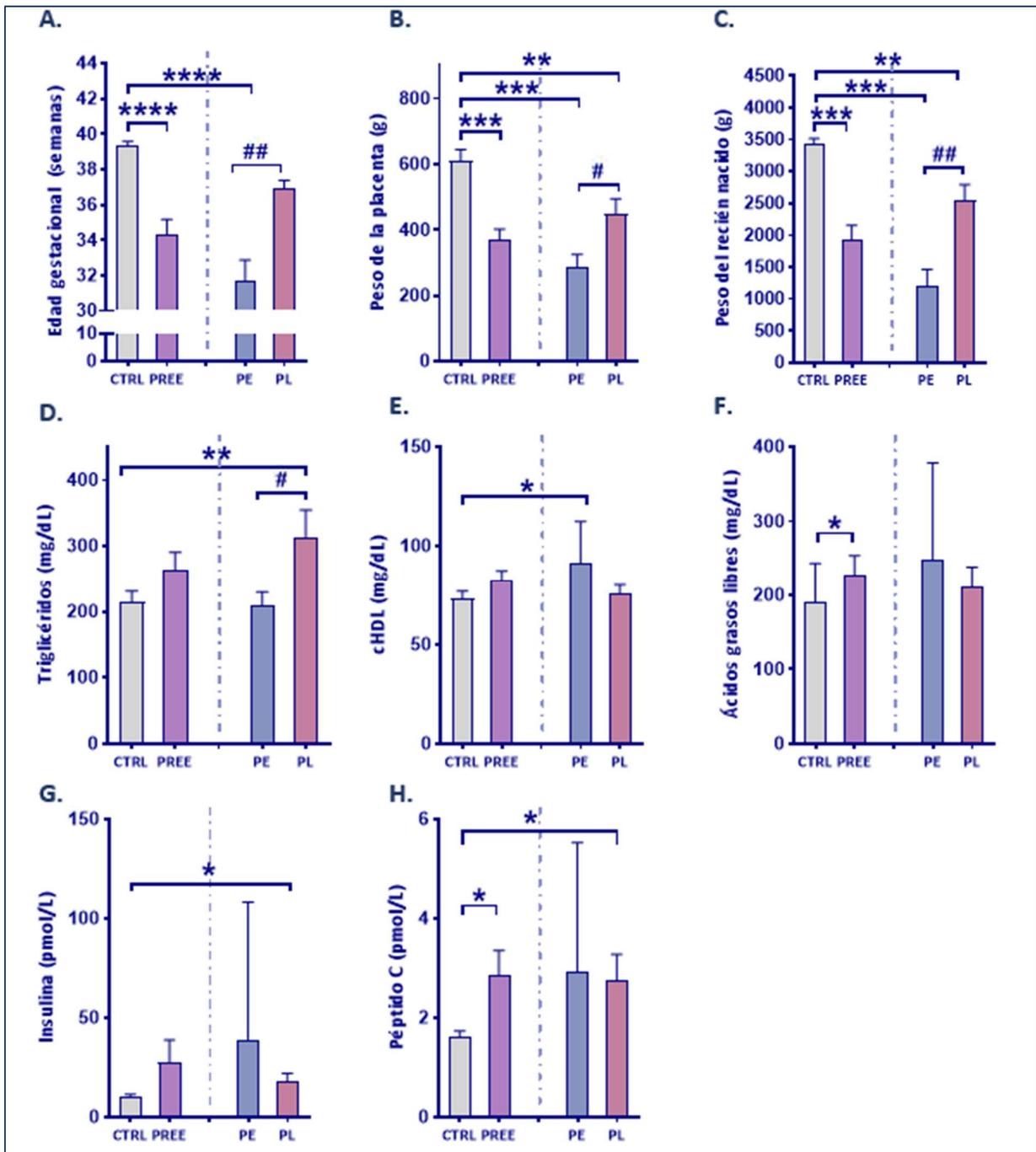


Figura 36. Datos clínicos y bioquímicos de la madre y el recién nacido.

En las gráficas se muestran los datos que mostraron diferencias estadísticamente significativas entre las mujeres con gestación no patológica, control (CTRL; gris) y el grupo de gestaciones complicadas con preeclampsia (PREE; morado). Este último grupo se subdividió en función del momento de aparición de la enfermedad como placentas procedentes de preeclampsia de aparición temprana (PE; azul) y preeclampsia de aparición tardía (PL; rojo). En las gráficas se representa la media y el error estándar. El análisis estadístico se realizó mediante el test *U de Mann Whitney*. Se consideraron resultados estadísticamente significativos * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$, (PREE vs. CTRL), y # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$, (PE vs. PL).

4.2.2.2 mRNA de transportadores en las distintas caras de las placentas complicadas con preeclampsia.

Como ya se ha mencionado, el estudio de expresión génica se realizó en las placentas a término recogidas tras el alumbramiento. De todos los resultados obtenidos en este estudio solo se comentarán en detalle aquellos que presentan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos, control y preeclampsia. En las **Figuras 37 y 38** se muestran los resultados obtenidos en el análisis por qPCR de diversos transportadores tanto en la cara materna como fetal de la placenta. Del mismo modo que en el apartado anterior, se realizó un estudio de correlación entre los niveles de mRNA de las proteínas transportadoras y los parámetros clínicos maternos, fetales y obstétricos. Para facilitar la presentación de los resultados solo se mostrarán las correlaciones que se observan en relación con las proteínas que muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. El resto de los resultados del análisis de correlación se recogen en el **Anexo II**. Para simplificar, los resultados se muestran en un *Heat-map* en el que se representa el valor de la *Rho de Spearman*, así como el *p-valor* (**Figura 39**).

En primer lugar, observamos que el mRNA de los transportadores de glucosa, **GLUT1** y **GLUT3**, está aumentado en las placentas con preeclampsia con respecto a las controles. Cuando se analizó el mRNA en las diferentes caras de la placenta se vio que el mRNA de *GLUT1* muestra diferencias entre las caras de la placenta en las mujeres con preeclampsia, siendo mayor en la cara fetal que en la materna (**Figura 37.A**). Esta diferencia no se observó en las placentas control. En el caso del transportador GLUT3 (**Figura 37.B**) se encontró un aumento estadísticamente significativo entre la cara fetal de las placentas de la cohorte con preeclampsia frente a las no patológicas, pero cuando se estudian estos niveles subclasificando el grupo en base al momento de la aparición de la patología, estas diferencias se pierden. La disminución en el número de muestras y la variabilidad que presentan seguramente contribuyen a esta pérdida de significancia, aunque si se mantiene la misma tendencia que cuando se estudian juntas, lo cual indica que el cambio observado es intrínseco a la preeclampsia, independiente del momento en el que se presenta.

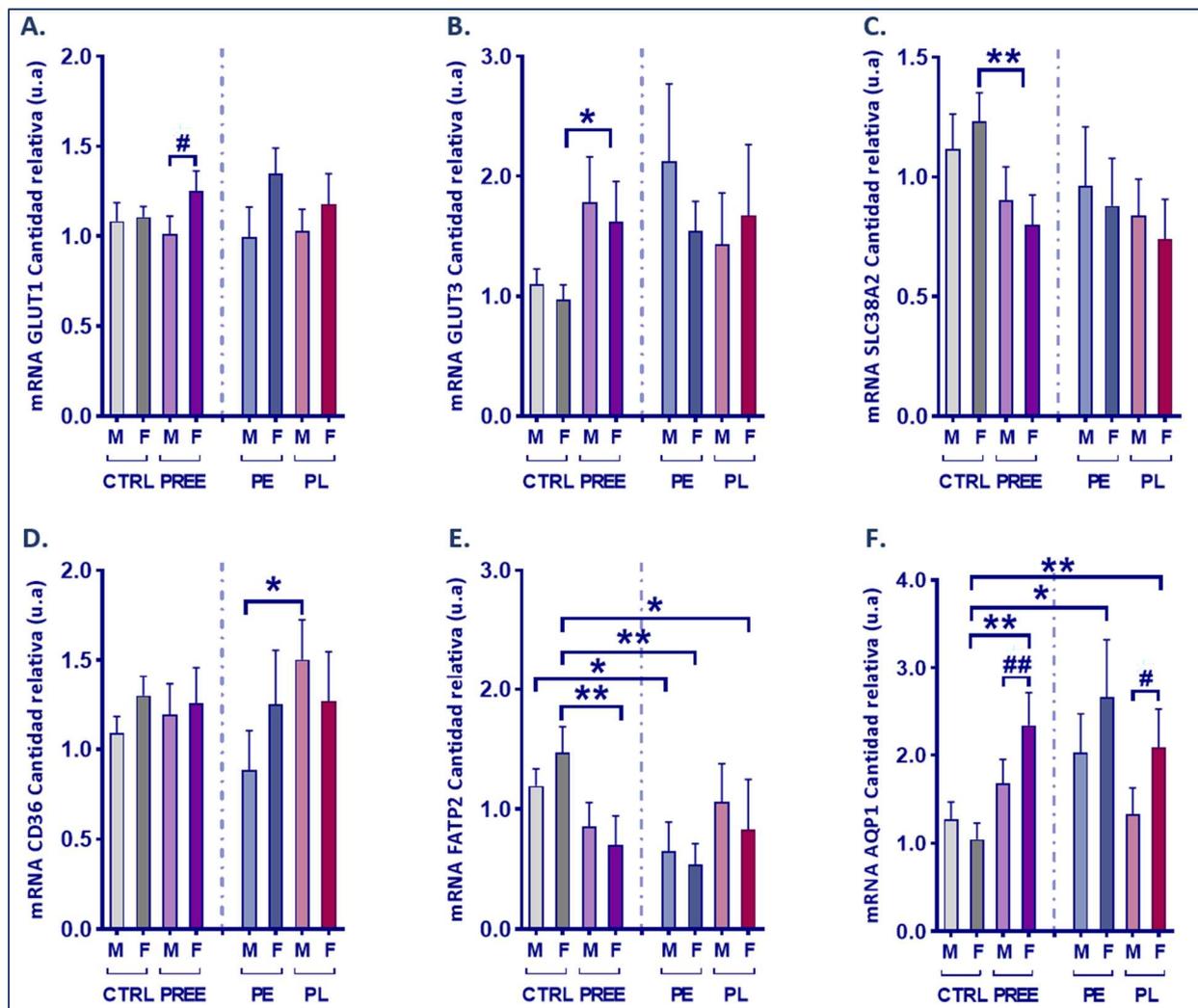


Figura 37. mRNA de transportadores en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y complicadas con preeclampsia que mostraron diferencias entre los grupos de estudio. El análisis se realizó en el grupo control (CTRL; gris) y el grupo de gestaciones complicadas con preeclampsia (PREE; morado). Este último grupo se subdividió en función del momento de aparición de la enfermedad como placentas procedentes de preeclampsia de aparición temprana (PE; azul) y preeclampsia de aparición tardía (PL; rojo). Determinación de mRNA por RT-qPCR del transportador de glucosa (*GLUT1*, A; *GLUT3*, B), el transportador de aminoácidos (*SLC38A2*, C), la translocasa de ácidos grasos (*CD36*, D), el transportador de ácidos grasos (*FATP2*, E) y la acuaporina 1 (*AQP1*, F). En las gráficas se representa la media y el error estándar del mRNA relativo respecto de la cara materna del grupo control. Las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F) de una misma placenta se analizaron mediante la prueba de *Wilcoxon*. Se consideraron resultados estadísticamente significativos $\#p < 0.05$ y $\#\#p < 0.01$ (F vs. M). Las diferencias entre las placentas de gestaciones control (CTRL) y gestaciones con preeclampsia (PREE; PE; PL), se analizaron mediante la prueba *U-Mann Whitney*. Se consideraron resultados estadísticamente significativos $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$. (PREE; PE; PL vs. CTRL).

Como podemos observar en el estudio de correlación en relación con los transportadores de glucosa, en las placentas de las mujeres control encontramos una asociación de GLUT1 con los niveles circulantes de PIGF (con GLUT 1 en la cara fetal) y sFlt1 (con GLUT1 en la cara materna) que no se encuentran en las placentas con preeclampsia. Parece que la expresión del transportador GLUT1 en la cara materna de las placentas en la preeclampsia temprana, está más asociado a la ganancia de peso de la gestante o el peso de la placenta, mientras que la expresión en la cara fetal correlaciona positivamente

con los niveles de glucosa y el índice HOMA y negativamente con la edad materna y los ácidos grasos circulantes en la madre.

En las placentas de las mujeres diagnosticadas con preeclampsia tardía solo observamos una correlación de la expresión de GLUT1 en la cara materna con los niveles de PGF circulantes maternos, que no se observa en la cara fetal.

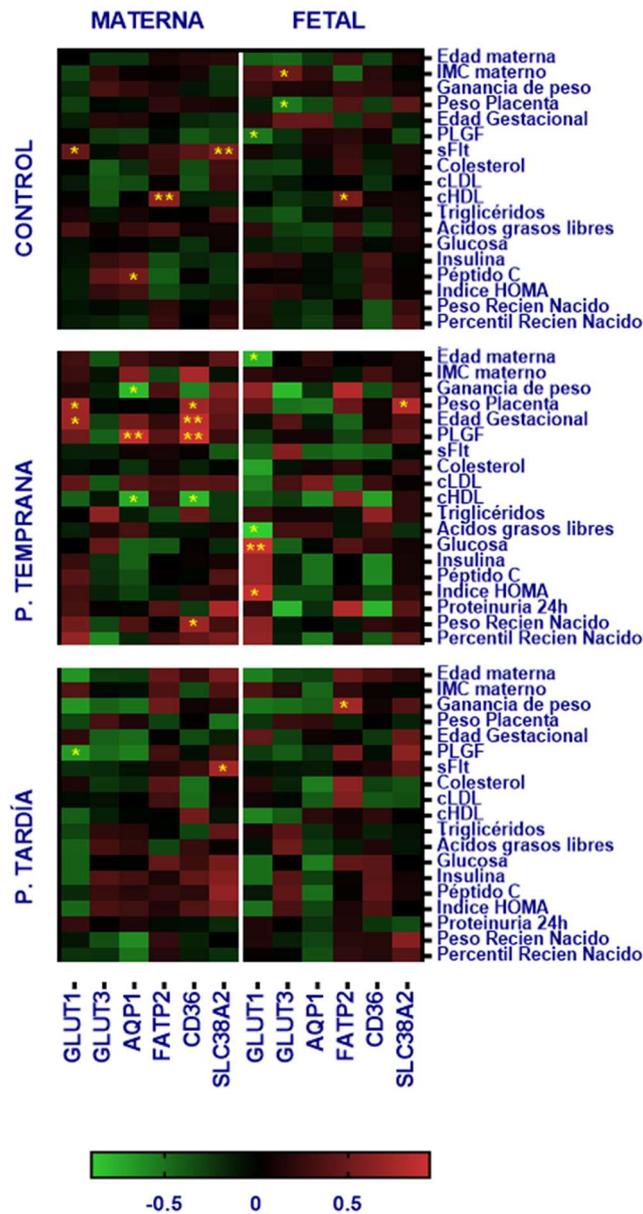


Figura 38. Heat-map en el que se representa la correlación entre los niveles de mRNA de los transportadores en la placenta y diversos parámetros clínicos. Se analizaron los datos de la correlación del mRNA con los parámetros clínicos, obstétricos y bioquímicas de la madre y el recién nacido, los resultados se muestran con el coeficiente de correlación de Spearman (S_p) entre variables. Se consideraron correlaciones estadísticamente significativas con $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$. Los parámetros incluidos fueron: edad materna (años), IMC materno pregestacional (Kg/m^2), ganancia de peso de la mujer durante la gestación (Kg), peso de la placenta (g), edad gestacional (semanas), PLGF (pg/ml), sFLT1 (pg/ml), colesterol total (mg/dl), colesterol asociado a LDL (cLDL, mg/dl), colesterol asociado a HDL (cHDL, mg/dl), ácidos grasos libres (mmol/L), glucosa (mg/dl), insulina ($\mu\text{U}/\text{mL}$), péptido C (ng/mL), índice HOMA, peso del recién nacido (g), percentil del recién nacido.

Existe controversia en la literatura respecto a cómo afectan las condiciones de hipoxia a la expresión de los transportadores de glucosa. Por un lado, se ha descrito como HIF-1 α afecta directamente a la expresión de los transportadores de glucosa, siendo mayor cuanto mayor es la condición de privación de oxígeno ([Chang, Chao, Chang, & Cheng, 2021](#)), de forma similar a lo que se ha descrito en las células tumorales que proliferan en un ambiente de hipoxia ([H. Zhao et al., 2021](#)). Este aumento de la expresión de transportadores de glucosa por efecto de la hipoxia se ha descrito tanto para GLUT1 como para GLUT3 en células BeWo, células de trofoblasto y explantes de placenta. Además, se ha descrito que HIF-1 podría estar modulando la regulación al alza de la expresión de los GLUTs ([Baumann et al., 2007](#)). El papel de HIF-1 α como regulador de la expresión de GLUT3 se ha puesto de manifiesto también en otras situaciones. Así, se ha descrito que GLUT3 aumenta en la cara materna de las placentas de gestaciones con retraso en el crecimiento intrauterino a consecuencia de una mala perfusión placentaria ([Chang et al., 2021](#)), o en la placenta de primer trimestre, proponiendo los autores que en ambos casos este cambio está asociado a la hipoxia ([Janzen et al., 2013](#)).

Esta adaptación de la placenta a la hipoxia con un aumento en la expresión de los GLUTs parece ser un mecanismo compensatorio a la baja disponibilidad de oxígeno, ya que en estas condiciones se ve comprometida la oxidación completa de la glucosa para obtener ATP. Así, en situación de hipoxia, la placenta capta mayor cantidad de glucosa para obtener más energía para ella misma y así permitir su proliferación, diferenciación e invasión celular, pero no tanto para proporcionar un mayor suministro de ATP o glucosa al feto.

Los estudios publicados hasta la fecha no han analizado si los cambios de expresión de los GLUTs, como consecuencia de la preeclampsia, se producen por igual en ambas caras de la placenta. Nuestro estudio, es el primero, al menos en nuestro conocimiento, en el que se ha analizado la distribución de los GLUTs en esta patología. Así, mientras que GLUT3 se expresa de forma similar en ambas caras de la placenta tanto en gestación normal como en preeclampsia, en el caso de GLUT1 encontramos una mayor expresión en la cara fetal de las placentas con preeclampsia, pero no en la gestación normal. Parece que mientras que GLUT3 estaría contribuyendo a esa entrada de glucosa a la placenta en condiciones de hipoxia para su propio metabolismo, la mayor expresión de GLUT1 específicamente en la cara fetal, podría servir como mecanismo que permitiría una mayor disponibilidad de glucosa también para garantizar un adecuado crecimiento fetal.

En 2019, Vogtmann, R. y colaboradores, generaron un modelo de ratón transgénico en el que se indujo la expresión de *sFLT1* humano. La expresión de los GLUTs era menor en las placentas de los ratones que tenían inducida la expresión de *sFLT1*. Con este estudio se plantea que el desequilibrio de los factores angiogénicos y antiangiogénicos durante la gestación conducen, entre otras cosas, a una alteración en el transporte de nutrientes a través de la placenta que puede desencadenar en la restricción del crecimiento

intrauterino ([Vogtmann et al., 2019](#)). Precisamente, en nuestro estudio hemos encontrado una mayor expresión de los transportadores de nutrientes *GLUT1* y *GLUT3* en las placentas con preeclampsia respecto a los controles. Además, los resultados obtenidos en el estudio de correlación, que se muestra más adelante (**Figura 46**), reflejan como unos mayores niveles de *sFLT1* en la placenta se asocian con un menor peso del recién nacido y como la expresión de *GLUT1* correlaciona positivamente con factores antiangiogénicos circulantes, como *sFLT1*. Cuanto mayores son los niveles de factores angiogénicos, menos se expresan los transportadores de glucosa. En las placentas control la expresión de *GLUT1* correlaciona positivamente con *sFLT1* y negativamente con *PIGF*, sin embargo, esto no se observa en las placentas con preeclampsia.

En relación con el transporte de aminoácidos hemos observado que los niveles de mRNA del transportador **SLC38A2** están disminuidos en la cara fetal de las gestantes con preeclampsia respecto al control, pero cuando se estudia subclasificando el grupo en función del momento de la aparición de la patología, estas diferencias se pierden (**Figura 37.C**). La disminución en el número de muestras y la variabilidad que presentan seguramente contribuyen a esta pérdida de significancia, aunque, como se puede observar, si se mantiene la misma tendencia que cuando se estudian todas juntas. Este resultado sugiere que el cambio observado en este transportador es intrínseco a la preeclampsia, independientemente del momento en el que se presenta.

En el estudio de correlación muestra como en la cara materna de las placentas control la expresión de *SLC38A2* correlaciona positivamente con los niveles circulantes en la madre de *sFlt1* y, aunque esta correlación se pierde en las placentas con preeclampsia de aparición temprana, se mantiene en las placentas con preeclampsia de aparición tardía. Parece, por tanto, que el aumento de factores antiangiogénicos en las placentas control se asocia con la expresión del transportador mientras que esto en las placentas con preeclampsia de aparición temprana no ocurre.

En cuanto a los transportadores de ácidos grasos estudiados, observamos como los niveles del mRNA de **CD36** son diferentes entre la cara materna de las placentas con preeclampsia de aparición temprana y las de aparición tardía (**Figura 37.D**). Por su parte **FATP2** (**Figura 37.E**) se expresa menos en las placentas con preeclampsia, siendo más acusada esta diferencia en la cara fetal de las placentas, independientemente del momento de la aparición. En el caso de las placentas con preeclampsia de aparición temprana esta disminución se observa en ambas caras. El estudio de correlación, **Figura 39**, mostró que *CD36* correlaciona negativamente en la cara materna de las placentas con preeclampsia de aparición temprana con la ganancia de peso de la gestante y los niveles de colesterol-HDL. Además, se observa que este transportador correlaciona positivamente con el peso de la placenta, la edad gestacional, los niveles de *PGF* y el peso del recién nacido. En el caso de *FATP2* las correlaciones

observadas en las placentas de preeclampsia reflejan como se pierde la asociación positiva con los niveles de colesterol-HDL, que sí se observa en ambas caras de las placentas control.

CD36 es una traslocasa de ácidos grasos que promueve la captación y almacenamiento de ácidos grasos en las células. Además, CD36 es un receptor de membrana de la trombospondina 1 (TSP-1) con actividad tirosina quinasa. La interacción CD36-TSP1 activa varias rutas de señalización, entre ellas la señalización de la apoptosis de células endoteliales, y está involucrada en procesos de regulación de sincitización de las células de citotrofoblasto. Se ha descrito por varios autores que la expresión de CD36 disminuye en las placentas con preeclampsia ([Gutierrez & Gutierrez, 2021](#); [Koundouros & Poulgiannis, 2020](#));([Duan et al., 2021](#); [Weedon-Fekjær et al., 2010](#)), ([Weedon-Fekjær et al., 2010](#)) ([Vogtmann et al., 2019](#)). En nuestro estudio no hemos visto esta diferencia al analizar todas las placentas de preeclampsia juntas, pero si hemos encontrado que en la cara materna de las placentas de preeclampsia temprana presentan una disminución de *CD36* en comparación con las placentas de preeclampsia tardía. No podemos por tanto descartar que la ausencia de diferencias se deba a la diferente expresión del transportador en función del momento en el que se presenta la enfermedad. De hecho, es sólo en este grupo donde se han encontrado asociaciones con diversos parámetros clínicos, como el menor peso de la placenta y el recién nacido.

La expresión de *FATP2* en la placenta en relación con la preeclampsia, se ha descrito en diversos tipos celulares y modelos *in vivo*. Así se ha mostrado la expresión del transportador tanto en una línea de trofoblasto humano como en un modelo de ratón en condiciones de hipoxia, en el que se observó además que la expresión de *FATP2* no afecta al crecimiento fetal intrauterino ([Mishima et al., 2011](#)). En un estudio posterior se describió en células BeWo que la expresión de *FATP2* aumenta en situación de hipoxia ([Jadoon et al., 2015](#)). En relación con la distribución en los distintos compartimentos de la placenta, se ha descrito que la expresión de *FATP2* en la placenta esta polarizada y se expresa cuatro veces más en la membrana basal que en las microvellosidades ([Lager et al., 2016](#)). En contraste con lo encontrado en la bibliografía, los resultados observados en nuestro estudio muestran una menor expresión de *FATP2* en la placenta humana con preeclampsia respecto a las placentas control, independientemente del momento de la aparición de la patología y de la cara de la placenta. Esta diferencia se puede deber a que nuestro estudio es en placenta humana de tercer trimestre y la mayor parte de estos estudios que han encontrado un aumento de la expresión, se han realizado bien en líneas celulares sometidas a hipoxia, o bien en modelos murinos. En este sentido es importante señalar que se ha descrito que la expresión de *FATP2* es diferente en humano que en ratón, expresándose en éste último fundamentalmente en el amnios, pero no en la placenta ([Mishima et al., 2011](#)).

Además de los transportadores de glucosa y ácidos grasos, hemos visto cambios también en los niveles de mRNA de otros transportadores, como la acuaporina 1 (**AQP1**), canal que se encarga del

transporte de agua en la célula ([Luo, Liu, Song, Hua, & Zhu, 2020](#)), aunque también es un canal catiónico activado directamente por GMPc e indirectamente por AMPc. Parece que, a diferencia de otras isoformas de acuaporina, AQP1 no transporta glicerol. Como se puede ver en la **Figura 37.F**, las placentas con preeclampsia presentan una expresión diferencial del transportador entre las caras de la placenta, siendo mayor en la cara fetal que en la materna, particularmente en el grupo de preeclampsia tardía. Sin embargo, en las placentas de gestación control el mRNA de AQP1 es similar entre ambas caras de la placenta. De hecho, el nivel de mRNA de AQP1 es mayor en la cara fetal de las placentas con preeclampsia respecto a la cara fetal de las placentas control, independientemente del momento de aparición de la enfermedad.

Aunque en el estudio de correlación (**Figura 39**) no encontramos ninguna asociación entre la expresión de AQP1 en las placentas con preeclampsia tardía, si observamos que en la cara materna de las placentas de las gestantes con preeclampsia temprana la ganancia de peso de la gestante y los niveles de colesterol-HDL correlacionan negativamente con la expresión de este transportador. Además, en este mismo grupo se observa una fuerte asociación positiva con los niveles de PGF (0,893**), de manera que, cuanto mayores son los niveles de PGF en la sangre materna, mayor es la expresión de AQP1 en la cara materna de las placentas.

En estudios de otros grupos se ha descrito también que la expresión de AQP1 está aumentada en las placentas con preeclampsia y que este aumento se correlaciona con los niveles de líquido amniótico ([H. Ding et al., 2022](#); [L. X. Li, Liu, Wen, Li, & Zhao, 2008](#)). Además, en la bibliografía se ha descrito el papel de las acuaporinas en la regulación de la angiogénesis, la proliferación celular y el metabolismo lipídico entre otros procesos. Se ha descrito que AQP1 se sobreexpresa en numerosos procesos tumorales, y que este aumento está promovido por la glucólisis inducida por la hipoxia ([Tomita et al., 2017](#); [Traberg-Nyborg et al., 2022](#)). Por lo tanto, podría ser la hipoxia uno de los factores responsables de que tanto la expresión de AQP1 como GLUT1 y GLUT3 esté aumentada en las placentas con preeclampsia.

Además de estos transportadores, también se incluyeron en el estudio las acuaporinas 9 y 11, así como el transportador de aminoácidos SLC7A7 y el transportador de colesterol ABCA1. Los niveles de mRNA de estas cuatro proteínas no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos (**Figura 38**).

En conjunto hemos observado como en la cara fetal de las placentas con preeclampsia se produce un aumento de los niveles de mRNA de GLUT1 y AQP1 en comparación con la cara materna. Los niveles de mRNA de FATP2 y SLC38A2 se encuentran disminuidos en la cara fetal de las placentas con preeclampsia respecto a la cara fetal de los controles, mientras que el mRNA de GLUT3 se encuentra aumentado en ambas caras de las placentas con preeclampsia en comparación con el control; el mRNA

de *CD36* únicamente se ve disminuido en la cara materna de las placentas con preeclampsia de aparición temprana. Se ha descrito que *sFLT1* está directamente relacionado con el aumento de transportadores ([Chang et al., 2021](#)) y con la hipoxia ([H. Zhao et al., 2021](#)) en la placenta. Por tanto, se podría hipotetizar que la angiogénesis defectuosa genera un ambiente hipóxico y para compensar la deficiente obtención de ATP, se favorece la sobreexpresión de estos transportadores. Es posible, que el aumento más marcado en la cara fetal de las placentas pueda deberse o bien a un mayor grado de hipoxia en esta cara de la placenta, o bien a un mecanismo compensatorio para favorecer una suficiente disponibilidad de nutrientes.

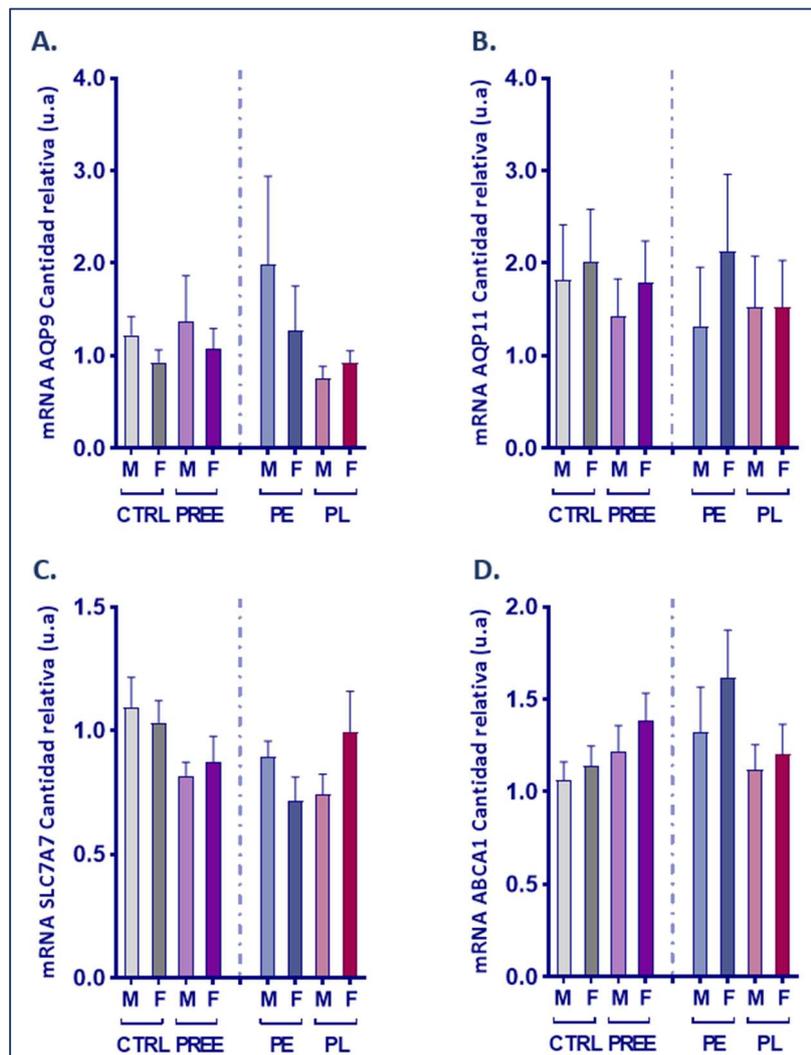


Figura 39. mRNA de transportadores en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y gestaciones complicadas con preeclampsia que no mostraron diferencias entre los grupos de estudio. El análisis se realizó en el grupo control (CTRL; gris) y el grupo de gestaciones complicadas con preeclampsia (PREE; morado). Este último grupo se subdividió en función del momento de aparición de la enfermedad como placentas procedentes de preeclampsia de aparición temprana (PE; azul) y preeclampsia de aparición tardía (PL; rojo). Determinación de mRNA por RT-qPCR de la acuaporina 9 (*AQP9*, A), la acuaporina 11 (*AQP11*, B), el transportador de aminoácidos (*SLC7A7*, C), y el transportador de colesterol (*ABCA1*, D). En las gráficas se representa la media y el error estándar del mRNA relativo respecto de la cara materna del grupo control. Las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F) de una misma placenta se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon. Las diferencias entre las placentas de gestaciones control (CTRL) y gestaciones con preeclampsia (PREE; PE; PL), se analizaron mediante la prueba *U-Mann Whitney*.

4.2.2.3 Expresión de enzimas del metabolismo lipídico.

A continuación, se estudió si además de los cambios en los transportadores, la preeclampsia se asociaría también a cambios en la distribución de enzimas que participan en el metabolismo lipídico entre las dos caras de la placenta, se analizaron por qPCR los niveles del mRNA de enzimas clave. Los resultados se muestran en la **Figura 40** y la **Figura 42**.

El análisis de los genes que codifican para enzimas involucradas en la β -oxidación, mostró una disminución del mRNA de muchas de ellas en las placentas del grupo de gestantes con preeclampsia, como es el caso de las enzimas **LCHAD** (3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa de cadena larga) y **MCAD** (acil CoA-deshidrogenasa de cadena media) (**Figura 40 A y B** respectivamente). Como se puede observar, hay una disminución estadísticamente significativa en el mRNA de *LCHAD*, tanto en la cara materna como en la cara fetal de las placentas con preeclampsia. En el caso de *MCAD* es en la cara fetal de las placentas procedentes de gestaciones con preeclampsia, en las que se encuentran unos niveles significativamente más bajos de mRNA que en las placentas de gestaciones no patológicas, aunque se observó la misma tendencia. En ambas enzimas los cambios observados no parecen depender del momento en el que se desarrolló la preeclampsia y tampoco hubo diferencias significativas entre ambas caras de la placenta.

En las placentas control la expresión de LCHAD en la cara materna correlaciona negativamente con el IMC materno, mientras que en la cara fetal correlaciona positivamente con los niveles de colesterol-HDL y con los ácidos grasos, mientras que en las placentas con preeclampsia no se observa esta asociación. En las placentas de preeclampsia temprana sólo se observó una correlación de la expresión de LCHAD en la cara fetal con la ganancia de peso materno, mientras que en las de preeclampsia tardía correlaciona positivamente con la ganancia de peso materno, el PIGF, el peso y percentil del recién nacido.

La expresión de MCAD no correlaciona con los parámetros clínicos en las placentas control, sin embargo, en las placentas de preeclampsia temprana, el mRNA de la enzima en la cara fetal correlaciona positivamente con el IMC materno y con el peso del recién nacido. Por su parte, en las placentas de las gestaciones complicadas con preeclampsia tardía, la expresión de MCAD en la cara materna correlaciona negativamente con el peso del recién nacido, mientras que la expresión en la cara materna correlaciona positivamente con el peso de la placenta y negativamente con sFlt1. Parece que en este caso el ambiente antiangiogénico se asocia con una disminución de la expresión de la enzima en la cara fetal.

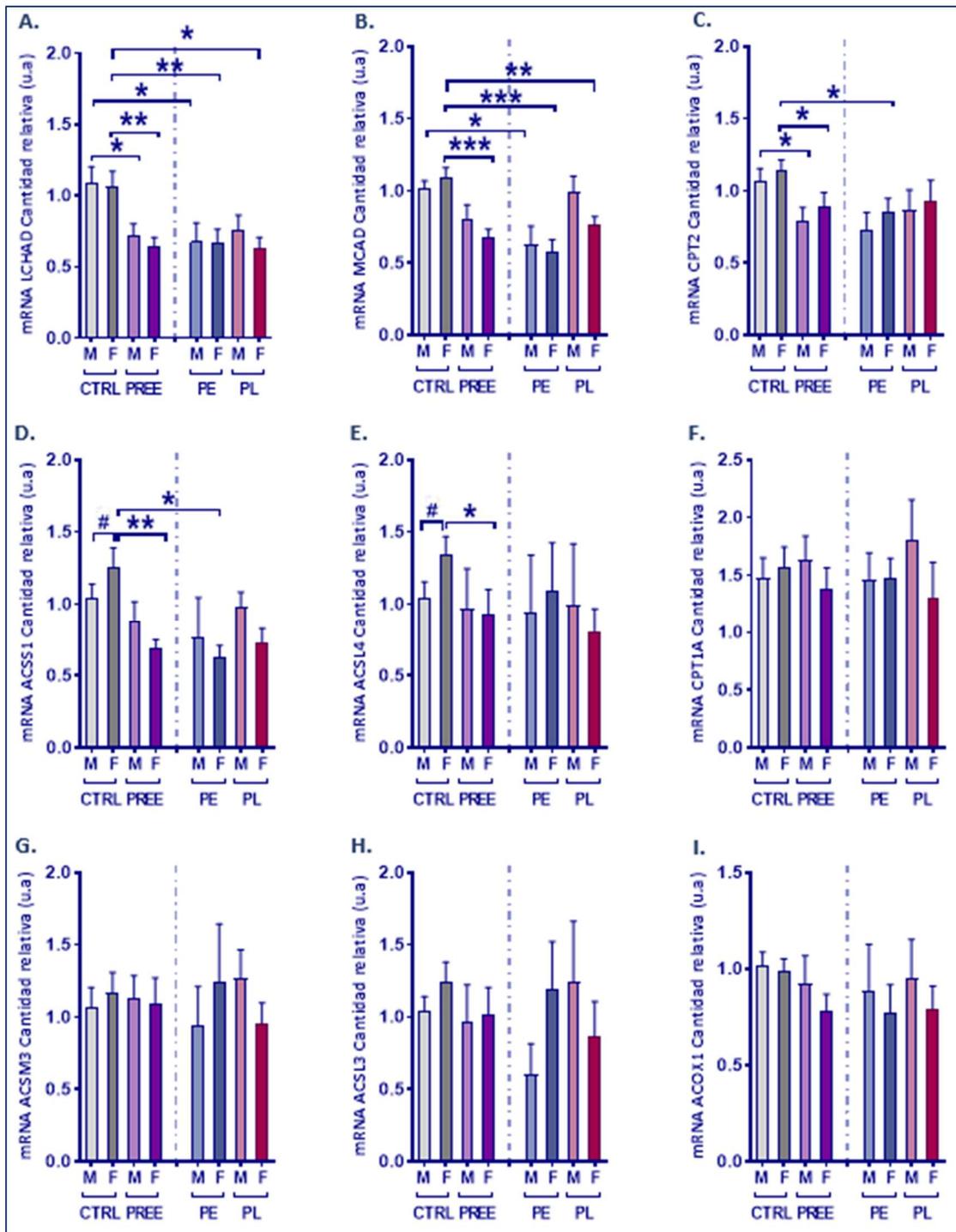


Figura 40. mRNA de proteínas implicadas en la β oxidación de ácidos grasos en las distintas caras de la placenta procedente de gestaciones no-patológicas y gestaciones complicadas con preeclampsia. El análisis se realizó en el grupo control (CTRL; gris) y el grupo de gestaciones complicadas con preeclampsia (PREE; morado). Este último grupo se subdividió en función del momento de aparición de la enfermedad como preeclampsia de aparición temprana (PE; azul) y preeclampsia de aparición tardía (PL; rojo). Determinación de mRNA por RT-qPCR de hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (*LCHAD*, A), Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (*MCAD*, B), carnitina palmitoil transferasa 2 (*CPT2*, C), Acil-CoA sintasa 1 de cadena corta (*ACSS1*, D), Acil-CoA sintasa 4 de cadena larga (*ACSL4*, E), carnitina palmitoil transferasa 1 α (*CPT1A*, F), Acil-CoA sintasa 3 de cadena media (*ACSM3*, G) Acil-CoA sintasa 3 de cadena larga (*ACSL3*, H), Acil-CoA Oxidasa 1 (*ACOX1*, I) En las gráficas se representa la media y el error estándar del mRNA relativo respecto de la cara materna del grupo control. Las diferencias entre la cara materna (M) y la fetal (F) de una misma placenta se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon. Se consideraron resultados estadísticamente significativos # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ (F vs. M). Las diferencias entre las placentas de gestaciones control (CTRL) y gestaciones con preeclampsia (PREE; PE; PL), se analizaron mediante la prueba *U-Mann Whitney*. Se consideraron resultados estadísticamente significativos * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. (PREE; PE; PL vs. CTRL)

Con el mismo objetivo que en los apartados anteriores se realizó un estudio de correlación entre los niveles de mRNA de las enzimas que mostraron diferencias entre los grupos con los parámetros clínicos maternos, fetales y obstétricos. De nuevo los resultados se muestran mediante un gráfico de *Heat-map* (Figura 41) en el que se representa el valor de *Rho de Spearman* y el *p-valor*.

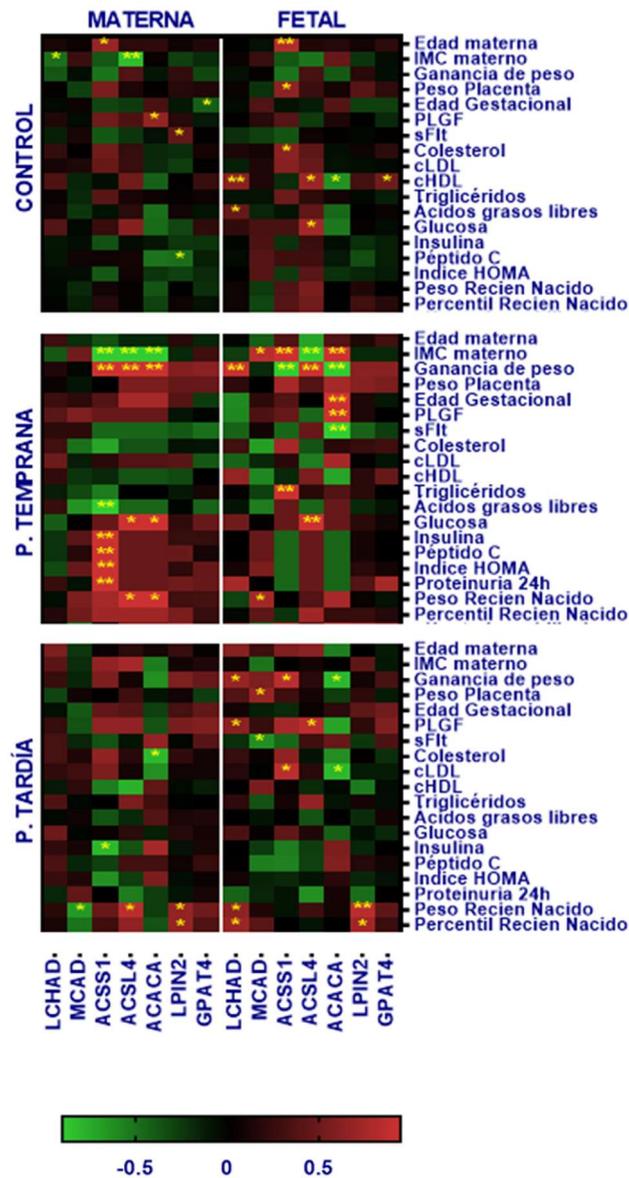


Figura 41. Heat-map en el que se representa la correlación entre los niveles de mRNA de enzimas del metabolismo lipídico en la placenta y diversos parámetros clínicos. Se analizaron los datos de la correlación del mRNA con los parámetros clínicos, obstétricos y bioquímicas de la madre y el recién nacido, los resultados se muestran con el coeficiente de correlación de Spearman ($S\rho$) entre variables. Se consideraron correlaciones estadísticamente significativas con $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$. Los parámetros incluidos fueron: edad materna (años), IMC materno pregestacional (Kg/m^2), ganancia de peso de la mujer durante la gestación (Kg), peso de la placenta (g), edad gestacional (semanas), PLGF (pg/ml), sFLT1 (pg/ml), colesterol total (mg/dl), triglicéridos (mg/dl) colesterol asociado a LDL (cLDL, mg/dl), colesterol asociado a HDL (cHDL, mg/dl), ácidos grasos libres (mmol/L), glucosa (mg/dl), insulina ($\mu\text{U}/\text{mL}$), péptido C (ng/mL), índice HOMA, proteinuria, peso del recién nacido (g), percentil del recién nacido.

En 1999 se publicaron varios artículos en los que se describía como una mutación autosómica recesiva, G1528C, en el gen de la LCHAD se asociaba con complicaciones del embarazo, como la preeclampsia entre otras ([Ibdah, Dasouki, & Strauss, 1999](#); [Strauss et al., 1999](#); [Tyni & Pihko, 1999](#)). Posteriormente, en 2002, se hipotetizó que defectos en la actividad de la LCHAD en la placenta podrían estar detrás del desarrollo de enfermedades del embarazo como la preeclampsia ([Rakheja, Bennett, Foster, Domiati-Saad, & Rogers, 2002](#)), y algunos años después se describió como en las placentas con preeclampsia de aparición temprana había un nivel de expresión menor de *LCHAD*, respecto a los controles, aunque no se observaba esta diferencia en la cohorte con preeclampsia de aparición tardía ([J. L. Wang, Yang, Wang, & Zhu, 2008](#)).

La confirmación de que algún parámetro circulante en la preeclampsia podría estar en el origen del cambio de expresión de *LCHAD* proviene de un estudio en el que se incubó una línea celular de trofoblasto con suero de gestantes control y con preeclampsia de aparición temprana o tardía. Los resultados del estudio mostraron que sólo cuando se incubaban las células con suero de mujeres con preeclampsia de aparición temprana se producía una disminución tanto en la proteína como en el mRNA de *LCHAD* que no tenía lugar en las de aparición tardía ([Sun et al., 2011](#)). En este sentido, en un modelo murino se ha descrito que al inhibir la producción de óxido nítrico (NO) en estadios tempranos de la gestación, pero no en tardíos, se promueve la disminución de LCHAD, tanto a nivel de mRNA como de proteína ([Ma, Sun, & Yang, 2011](#)). Posteriormente se han publicado otros estudios que confirman la disminución en *LCHAD* en las placentas con preeclampsia de aparición temprana, así como una reducción en la oxidación de ácidos grasos de cadena larga ([Bartha, Visiedo, Fernández-Deudero, Bugatto, & Perdomo, 2012](#); [X. Ding, Yang, Han, & Yu, 2014b](#); [Han, Yang, Ding, Yu, & Yi, 2015](#); [Khaire, Thakar, Wagh, & Joshi, 2021](#); [Sun et al., 2013](#)).

El papel de este cambio en la oxidación de los ácidos grasos en la preeclampsia también se ha estudiado previamente. Así, se ha propuesto que defectos en la oxidación de ácidos grasos de cadena larga reducen la capacidad de invasión del trofoblasto ([H. Yu, Yang, Ding, Wang, & Han, 2014](#)). En el mismo sentido varios estudios en modelos animales han relacionado los defectos de la FAO en las placentas con preeclampsia con estrés oxidativo ([X. Ding, Yang, Han, & Yu, 2014a](#)) lo que llevó a los autores a concluir que la disminución en la oxidación de ácidos grasos promueve la patogenia de la enfermedad participando en procesos de estrés oxidativo y en procesos de inflamación en las células endoteliales ([X. Ding, Yang, Han, & Yu, 2015](#)). Así mismo se han analizado posibles asociaciones de la expresión de *LCHAD* en la placenta con diversos parámetros clínicos de las mujeres gestantes. En esta línea, se ha observado una correlación negativa de los niveles de expresión de *LCHAD* en las placentas con preeclampsia de aparición temprana con los niveles de ácidos grasos circulantes maternos, pero no con los triglicéridos ([F. Li et al., 2015](#)). En este mismo trabajo también se encontró una correlación negativa entre los niveles de expresión

de *LCHAD* en la placenta y el estrés oxidativo y la respuesta inflamatoria ([F. Li et al., 2015](#)). Por todo ello, algunos autores han apuntado a la deficiencia de *LCHAD* en la placenta con preeclampsia como posible diana terapéutica ya que, al menos en modelos animales, parece que el déficit de la enzima podría ser un mecanismo etiopatogénico de la preeclampsia, particularmente de la de aparición temprana ([Huai, Yang, Yi, & Wang, 2019](#); [Huai, Yang, Yi, Wang, & Xiang, 2018](#)).

En línea con estas evidencias, en nuestro trabajo hemos encontrado una disminución en la expresión de *LCHAD* en ambas caras de la placenta, tanto en gestaciones con preeclampsia de aparición temprana como en gestaciones con preeclampsia de aparición tardía. Además, nuestros resultados indican que la correlación de la expresión de *LCHAD* con parámetros clínicos maternos es significativa en la cara fetal de las placentas. Así hemos encontrado que mientras que en las placentas control hay una correlación positiva entre *LCHAD* y los niveles circulantes de ácidos grasos libres y colesterol-HDL, esta asociación no se observa en la preeclampsia, lo que podría favorecer una alterada oxidación de ácidos grasos que precisamente se encuentran incrementados en el grupo de las mujeres con preeclampsia.

Así como la expresión de *LCHAD* está ampliamente descrita en las placentas con preeclampsia, la de *MCAD* no ha sido tan estudiada. En nuestro trabajo hemos visto como el mRNA de esta enzima, al igual que ocurría con el de *LCHAD*, también se encuentra significativamente disminuido tanto en la cara materna como en la fetal e independientemente del momento de aparición de la preeclampsia, siendo en la cara fetal donde la disminución es mayor respecto de las placentas control. Si estos cambios en *MCAD* durante la preeclampsia están también asociados a una disminución en la producción de óxido nítrico y a una situación de estrés oxidativo, será objeto de estudios futuros.

Además de estos cambios en las enzimas que participan en la β -oxidación, también se analizó el mRNA de *CPT2* el sistema transportador implicado en la entrada a la mitocondria de los ácidos grasos de cadena larga. En la **Figura 40.C** se puede observar una disminución en los niveles del mRNA de *CPT2*, en ambas caras de las placentas con preeclampsia. Como se puede ver también en la misma figura, el nivel del mRNA de la enzima es igual en ambas caras de la placenta, independientemente del grupo. Parece por tanto que esta disminución es específica de la patología independientemente del momento en el que se desarrolle.

En conjunto, parece que, en la placenta de gestaciones complicadas con preeclampsia, particularmente en las de aparición temprana, no sólo la *LCHAD* y la *MCAD* sino también *CPT2*, presentan una disminuida expresión en la placenta, lo cual daría lugar a una disminución en la oxidación de ácidos grasos y como consecuencia se podría favorecer una mayor acumulación de lípidos en este tejido. El estudio de la actividad metabólica en ambas caras de estas placentas sería de interés para poder confirmar esta hipótesis.

A continuación, estudiamos el mRNA de otras enzimas implicadas en el metabolismo de los lípidos. Los niveles de mRNA de **ACSL4** (Acil-CoA sintetasa de cadena larga 4) (**Figura 40.E**) y **ACSS1** (Acil-CoA sintetasa de cadena corta 1) (**Figura 40.G**) también se encuentran disminuidos en la cara fetal de las placentas con preeclampsia respecto a la cara fetal de los controles. Mientras que en ambas enzimas el nivel de mRNA es mayor en la cara fetal respecto a la materna en las placentas de gestaciones no patológicas, estas diferencias se pierden en la preeclampsia, independientemente de cuando se desarrolle.

Apenas hay trabajos en la bibliografía en los que se haya abordado el estudio de la actividad de ACSL4 en la preeclampsia. Esta enzima activa los ácidos grasos de cadena larga produciendo el correspondiente acil-CoA, lo que les permite ingresar en distintas rutas metabólicas, incluyendo la biosíntesis de lípidos complejos como los fosfolípidos o la degradación de los ácidos grasos, una vez que han entrado en la mitocondria para la FAO. Se ha visto como las proteínas de la familia ACSL participan en procesos de invasión y de inhibición de apoptosis celular ([Y. Tang, Zhou, Hooi, Jiang, & Lu, 2018](#)). En un estudio realizado en células BeWo que fueron incubadas con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA) se observó como disminuía la expresión de *ACSL3*, *ACSL4*, *ACSL6*, *LPIN1* y *FABP3*, por lo que los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga participan en la regulación del propio metabolismo de ácidos grasos en la placenta lo cual podría afectar al desarrollo fetal ([Johnsen, Weedon-Fekjaer, Tobin, Staff, & Duttaroy, 2009](#)). Dado que en el grupo de mujeres con preeclampsia los ácidos grasos circulantes se encuentran elevados respecto al grupo control, se podría pensar que de algún modo contribuirían a la disminución en la expresión de *ACSL4* y lipina (ver más adelante). Además, algunos estudios en cáncer han mostrado una relación negativa de *HIF-1α* con *ACSL4* ([Y. Wang et al., 2022](#)), por lo que se podría especular que *HIF-1α*, y por tanto la hipoxia, estaría también contribuyendo a la disminuida expresión de la enzima en la placenta.

La enzima conocida como acil-CoA sintetasa de cadena corta o acetil-CoA sintasa (*ACSS1*), es una enzima presente en la mitocondria que se encarga de generar acetil-CoA que ingresa fundamentalmente en el ciclo del ácido cítrico para la obtención de energía, o bien participa en procesos de lipogénesis. Se ha visto que esta enzima además de generar acetil-CoA para la obtención de energía y lipogénesis, también participa en la regulación del metabolismo y en la captación de nutrientes en la célula ([Moffett, Puthillathu, Vengilote, Jaworski, & Namboodiri, 2020](#)). En la placenta humana, según datos del NCBI, la expresión de *ACSS1* es superior a la de *ACSS2*, la forma citosólica, y de hecho en nuestro estudio, no encontramos expresión de *ACSS2*. La expresión de *ACSS1* se encuentra disminuida en la cara fetal de las placentas con preeclampsia temprana. No hemos encontrado estudios que relacionen la expresión de *ACSS1* con la preeclampsia, pero sí hay algunos trabajos en los que se relaciona una aumentada expresión de *ACSS1* en distintos tumores, como en el carcinoma hepatocelular asociado a ambientes hipóxicos

(Bidkhorji et al., 2018). En base a estos estudios, parece que de nuevo es la hipoxia un factor determinante en la regulación de la expresión de estas enzimas.

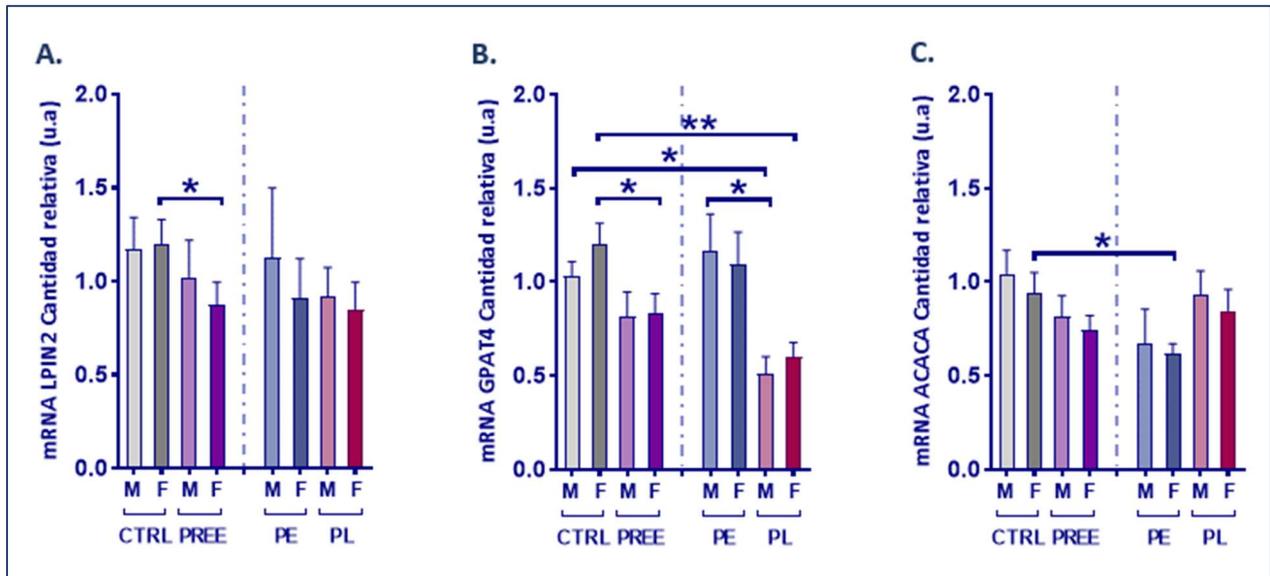


Figura 42. mRNA de proteínas implicadas en síntesis y esterificación de lípidos en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y gestaciones complicadas con preeclampsia. El análisis se realizó en el grupo control (CTRL; gris) y el grupo de gestaciones complicadas con preeclampsia (PREE; morado). Este último grupo se subdividió en función del momento de aparición de la enfermedad como placentas procedentes de preeclampsia de aparición temprana (PE; azul) y preeclampsia de aparición tardía (PL; rojo). Determinación de mRNA por RT-qPCR de lipina 2 (CPT1A, A), glicerol-3-fosfato aciltransferasa 4 (GPAT4, B), Acetil-CoA carboxilasa α (ACACA, C). En las gráficas se representa la media y el error estándar del mRNA relativo respecto de la cara materna del grupo control. En las gráficas se representa la media y el error estándar del mRNA relativo respecto de la cara materna del grupo control. Las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F) de una misma placenta se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon. Se consideraron resultados estadísticamente significativos # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ (F vs. M). Las diferencias entre las placentas de gestaciones control (CTRL) y gestaciones con preeclampsia (PREE; PE; PL), se analizaron mediante la prueba U-Mann Whitney. Se consideraron resultados estadísticamente significativos * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. (PREE; PE; PL vs. CTRL).

Se ha descrito como la expresión combinada de ACSS1 y ACSS2 en la célula determina la tasa de absorción de acetato y los niveles de acetato, están además relacionados con la acetilación de histonas, por lo que son claves en algunos procesos de regulación de la transcripción (Bulusu et al., 2017). En este sentido, se ha propuesto que el acetato participa en la regulación epigenética que promueve la síntesis de lípidos en condiciones de hipoxia, al activar la expresión de genes lipogénicos como ACACA o FASN, mediante mecanismos de acetilación de su región promotora. (Gao et al., 2016).

Por último, como se muestra en la **Figura 42**, el análisis del mRNA de otras isoenzimas implicadas en la β-oxidación, como CPT1A, ACOX1, ACSM3 y ACSL3 no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos.

Como se ha comentado anteriormente, ACSL4 y ACSS1 participan en la activación de los ácidos grasos, no sólo para su catabolismo, sino también para la incorporación de los ácidos grasos en los lípidos complejos. Por ello, se estudiaron también otras enzimas implicadas en la síntesis y esterificación de lípidos, como la lipina, proteína que participa en el proceso de esterificación de ácidos grasos para formar

triglicéridos, o la glicerol-3-fosfato aciltransferasa, que participa en la esterificación del glicerol 3-fosfato. Como se puede ver en la **Figura 42**, *LPIN2*, que codifica por lipina, y *GPAT4*, que codifica por la glicerol-3-fosfato aciltransferasa (**Figura 42 A y B** respectivamente) se encuentran menos expresadas en la cara fetal de las placentas con preeclampsia respecto a la cara fetal de las placentas control. Al analizar por separado la expresión en la cohorte de preeclampsia en función del momento de la aparición, se pierden las diferencias significativas en el caso de *LPIN2*, sin embargo, en el caso de *GPAT4* se observa cómo es claramente menor la expresión de la enzima en las placentas procedentes de preeclampsia de aparición tardía. Estos resultados apuntan a que las placentas con preeclampsia presentan menor tasa de esterificación.

El estudio de correlación de las enzimas involucradas en la esterificación de ácidos grasos, Lipina 2 y GPAT4 con los parámetros clínicos mostró que en las placentas control el mRNA de *LPIN2* en la cara materna está asociado positivamente con los niveles circulantes de sFlt-1 en la madre y negativamente con los del péptido C, pero estas asociaciones no se encuentran en las placentas de preeclampsia. Llama la atención también como en las placentas con preeclampsia tardía la expresión de *LPIN2* correlaciona positivamente con el peso y el tamaño del recién nacido, lo que tampoco se observaba en el grupo control. La expresión de *GPAT4* en las placentas apenas presenta correlación con los parámetros clínicos estudiados, excepto en el caso de las placentas control, donde a mayor nivel de colesterol-HDL, mayor es la expresión en la cara fetal de la placenta.

La lipina es una proteína que cataliza la defosforilación del ácido fosfatídico a diacilglicerol, como paso previo a la esterificación para síntesis de triglicéridos. Además, se ha descrito que lipina cumple funciones como regulador transcripcional, modulando la homeostasis de los lípidos ([Brohée et al., 2015](#)). Nuestros resultados reflejan que la expresión de *LPIN2* en las placentas de preeclampsia se encuentra disminuida en la cara fetal respecto a la misma cara de las placentas control. Cabe recordar, como se ha mencionado anteriormente, que los niveles de ácidos grasos circulantes se encuentran más elevados en las mujeres con preeclampsia, y que el tratamiento de células BeWo con PUFA induce una disminución en el mRNA de *LPIN1* ([Johnsen et al., 2009](#)). En nuestro estudio no encontramos correlación de *LPIN2* con los niveles de ácidos grasos circulantes maternos. Sin embargo, si hemos observado como la menor expresión de esta enzima en la placenta con preeclampsia tardía se asocia con un menor peso del recién nacido, probablemente por una menor disponibilidad de reservas energéticas.

Es llamativa la disminución en la expresión la enzima glicerol-3-fosfato aciltransferasa 4 (GPAT4) tanto en la cara materna como en la cara fetal de las placentas procedentes de gestaciones complicadas con preeclampsia de aparición tardía en comparación con las placentas control. La enzima GPAT4 cataliza la reacción entre el glicerol-3-fosfato y un acil-CoA, siendo su producto el ácido lisofosfatídico, y es limitante en la velocidad de biosíntesis de triglicéridos y fosfolípidos ([J. Yu et al., 2018](#)). Se han descrito

varias isoformas en humanos, codificadas por genes distintos, que se ubican en distintos compartimentos subcelulares, GPAT4 concretamente se ubica en el retículo endoplásmico y es, según datos del NCBI, la isoforma mayoritaria en la placenta. Esta isoforma muestra actividad catalítica frente a ácidos grasos de cadena larga. La actividad de esta enzima esta modulada por los niveles de insulina ([Shan et al., 2010](#)), y se ha relacionado con patologías metabólicas como la obesidad o la resistencia a la insulina.

Por tanto, en las placentas con preeclampsia la expresión disminuida de *LPIN2* y *GPAT4* favorecería una ralentización del metabolismo lipídico al verse afectada tanto la síntesis del ácido fosfatídico como su transformación en diacilglicerol.

Otra de las enzimas claves en el anabolismo de los lípidos es la acetil-CoA carboxilasa (ACACA), enzima limitante de la lipogénesis. En la **Figura 42.C** podemos observar como la expresión de **ACACA**, igual que ocurre con *ACSS1*, se encuentra disminuida en la cara fetal de las placentas de preeclampsia de aparición temprana en comparación con la cara fetal de las placentas control. En la cara materna de la placenta, aunque la tendencia fue similar, las diferencias no llegaron a ser estadísticamente significativas. La expresión de *ACACA* correlaciona positivamente en la cara fetal de las placentas control con los niveles de PIGF y negativamente con los niveles de colesterol-HDL. Además, la expresión de la enzima en la cara materna correlaciona positivamente con los niveles de glucosa, lo cual sugiere que debido a la mayor disponibilidad de glucosa se vería favorecida su captación por la placenta y por ende su incorporación a triglicéridos. No es por tanto de extrañar que además se asocie con el peso del recién nacido. Por su parte, en la cara materna el mRNA de la enzima correlaciona positivamente con la edad gestacional y PIGF y negativamente con sFlt. En las placentas de preeclampsia tardía la expresión de *ACACA*, no presenta el mismo perfil de correlación que en las controles, y se observa que en la cara materna correlaciona negativamente con los niveles de colesterol circulantes mientras que en la cara fetal correlaciona también negativamente con la ganancia de peso y el colesterol-LDL. En base a estas observaciones, parece que hay cierta relación entre la expresión y los parámetros relacionados con la angiogénesis y con parámetros antropométricos maternos.

Como se ha comentado la Acetil CoA carboxilasa, cataliza la transformación de acetil-CoA en malonil-CoA, siendo la enzima limitante de la velocidad de la síntesis de ácidos grasos *de novo*. En la bibliografía no se han encontrado muchos estudios que relacionen esta enzima con preeclampsia, pero si se ha descrito sobre su contribución al metabolismo de las células tumorales, como en células de cáncer de pulmón no microcítico ([E. Q. Li et al., 2019](#)) y también se ha propuesto como diana terapéutica para el desarrollo de fármacos para el tratamiento del síndrome metabólico ([L. Chen et al., 2019](#)). Como se ha comentado anteriormente, se ha descrito que el acetato participa en la regulación epigenética que promueve la síntesis de lípidos en condiciones de hipoxia, al activar la expresión de genes lipogénicos como *ACACA* o *FASN*, por mecanismos de acetilación de su región promotora ([Gao et al., 2016](#)). Parece

pues, que la disminuida expresión de *ACCS1*, se asociaría con una menor llegada de acetato a la cara fetal de la placenta con lo que la inducción de la transcripción de *ACACA* se vería afectada, tal y como hemos visto en la cara fetal de las placentas complicadas con preeclampsia de aparición temprana.

Otras enzimas analizadas que participan en el metabolismo y en la señalización celular en las que no encontramos diferencias entre los grupos fueron CBS y PI3K. Los resultados obtenidos en el análisis de los niveles de mRNA en estas enzimas se muestran en la **Figura 43**.

Los resultados de nuestro estudio coinciden en algunos casos con lo descrito previamente en la bibliografía ([X. Ding et al., 2015](#)), si bien es verdad que hemos encontrado muy pocos estudios que analicen la diferencia en la expresión de estas enzimas en las distintas caras de la placenta. En conjunto, los resultados obtenidos en nuestro trabajo en cuanto a las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico podemos afirmar, en términos generales, que el nivel de expresión de *LCHAD*, *MCAD*, *ACSL4*, *GPAT4* y *LPIN2* a nivel de su mRNA, se encuentra disminuido en las placentas con preeclampsia, no observándose en general diferencias entre las caras de la placenta, y que la hipoxia o un alterado balance angiogénico, podrían estar regulando estos cambios.

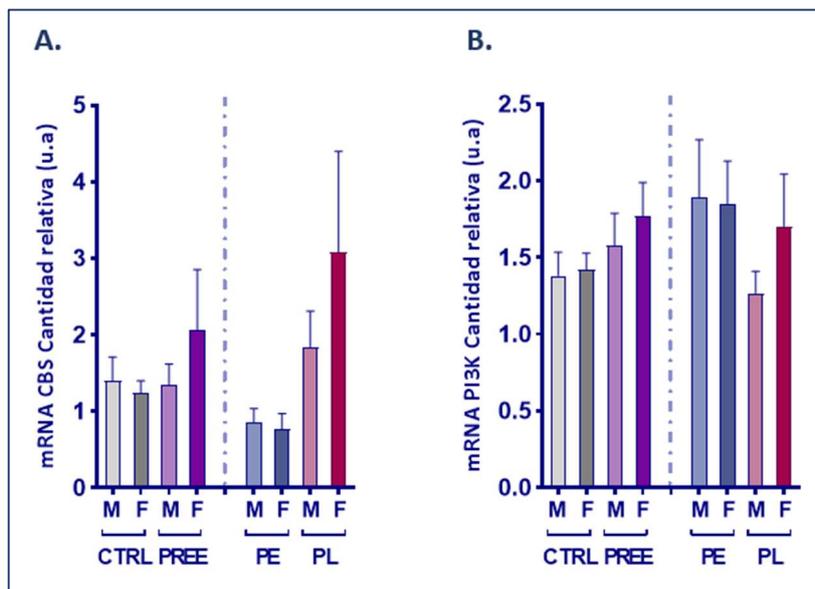


Figura 43. mRNA de proteínas del metabolismo, así como proteínas que participan en señalización en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y complicadas con preeclampsia que mostraron diferencias entre los grupos de estudio. El análisis se realizó en el grupo control (CTRL; gris) y el grupo de gestaciones complicadas con preeclampsia (PREE; morado). Este último grupo se subdividió en función del momento de aparición de la enfermedad como placentas procedentes de preeclampsia de aparición temprana (PE; azul) y preeclampsia de aparición tardía (PL; rojo). Determinación de mRNA por RT-qPCR de cistationina β sintasa (CBS, A), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K, B). En las gráficas se representa la media y el error

estándar del mRNA relativo respecto de la cara materna del grupo control. Las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F) de una misma placenta se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon. Las diferencias entre las placentas de gestaciones control (CTRL) y gestaciones con preeclampsia (PREE; PE; PL), se analizaron mediante la prueba U-Mann Whitney.

4.2.2.4 Expresión de proteínas que participan en angiogénesis y proliferación celular.

Finalmente abordamos el análisis de expresión de genes que codifican por proteínas involucradas en procesos angiogénicos y de proliferación celular. Los genes estudiados fueron, *sFLT1*, que codifica por el receptor 1 del factor de crecimiento vascular; VEGF, un receptor tirosina quinasa soluble que funciona

como receptor del factor de crecimiento endotelial vascular; PIGF, factor de crecimiento placentario que posee propiedades antiangiogénicas; *ENG*, que codifica por la endoglina, una glicoproteína de membrana tipo I localizada en la superficie de la célula formando parte del complejo receptor del TGF-beta que, en su forma soluble, posee también propiedades antiangiogénicas; *PGF*, que codifica por el PIGF, el factor de crecimiento que es ligando de FIT1 o VEGFR1, por lo que tiene una función angiogénica y *PTN*, que codifica por la pleiotrofina, una citoquina que promueve la expresión de VEGF y por tanto posee también propiedades angiogénicas.

Como se muestra en la **Figura 44**, encontramos que *sFLT1* y *ENG* están significativamente más expresados en la cara fetal de las placentas de mujeres con preeclampsia respecto a la cara fetal de las placentas de mujeres control. En el caso de *sFLT1*, además, observamos que en las placentas de preeclampsia la expresión en la cara fetal es mayor que en la materna.

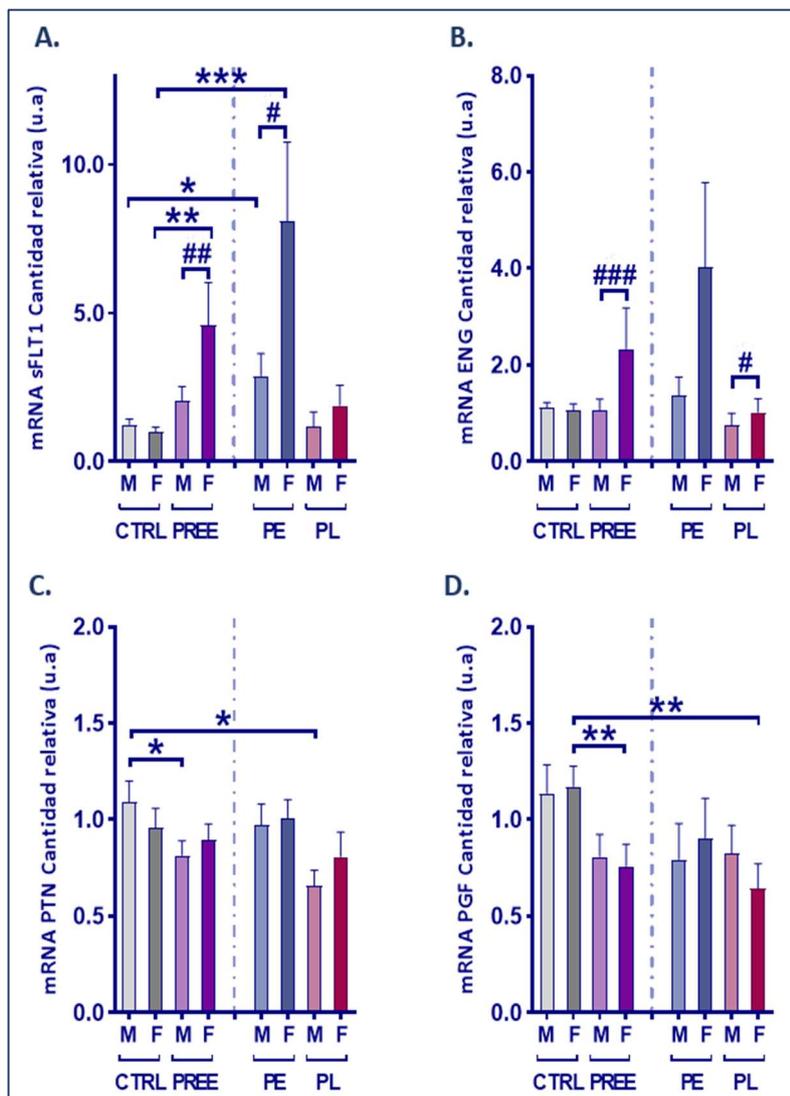


Figura 44. mRNA relativo de proteínas que participan en la angiogénesis y proliferación celular, en las distintas caras de la placenta de tercer trimestre procedente de gestaciones no-patológicas y complicadas con preeclampsia y que mostraron diferencias entre los grupos de estudio. El análisis se realizó en el grupo control (CTRL; gris) y el grupo de gestaciones complicadas con preeclampsia (PREE; morado). Este último grupo se subdividió en función del momento de aparición de la enfermedad como placentas procedentes de preeclampsia de aparición temprana (PE; azul) y preeclampsia de aparición tardía (PL; rojo). Determinación de mRNA por RT-qPCR de factores que participan en la angiogénesis como endoglina (*ENG*, A) y sFLt-1 (*sFLT1*, B), pleiotrofina (*PTN*, C) y factor de crecimiento placentario (*PGF*, D). En las gráficas se representa la media y el error estándar del mRNA relativo respecto de la cara materna del grupo control. Las diferencias entre la cara materna (M) y la cara fetal (F) de una misma placenta se analizaron mediante la prueba de Wilcoxon. Se consideraron resultados estadísticamente significativos # $p < 0.05$ y ## $p < 0.01$ (F vs. M). Las diferencias entre las placentas de gestaciones control (CTRL) y gestaciones con preeclampsia (PREE; PE; PL), se analizaron mediante la prueba *U-Mann Whitney*. Se consideraron resultados estadísticamente significativos * $p < 0.05$ y ** $p < 0.01$. (PREE; PE; PL vs. CTRL).

En el estudio de correlación que se muestra en la **Figura 45** se puede observar como en las placentas procedentes de gestaciones complicadas con preeclampsia tardía apenas hay correlaciones con los datos bioquímicos y clínicos analizados, siendo las placentas de preeclampsia temprana donde se observa un mayor número de asociaciones para todos los genes estudiados, en especial en la cara fetal. Así, hemos visto que los niveles de mRNA de *sFLT1* en la cara materna de las placentas, tanto de las gestantes control como de las de preeclampsia, no correlacionan con los parámetros clínicos estudiados. Sin embargo, en la cara fetal de las placentas control existe una correlación positiva con los ácidos grasos libres y con el peso del recién nacido. En el caso de las placentas con preeclampsia de aparición temprana, la expresión de *sFLT1*, al contrario que en los controles, correlaciona negativamente con el peso del recién nacido (**Figura 46**) y además también correlaciona negativamente con el IMC materno. Así mismo, presenta una correlación positiva con el colesterol-HDL y con la proteinuria, uno de los principales signos asociados con la preeclampsia.

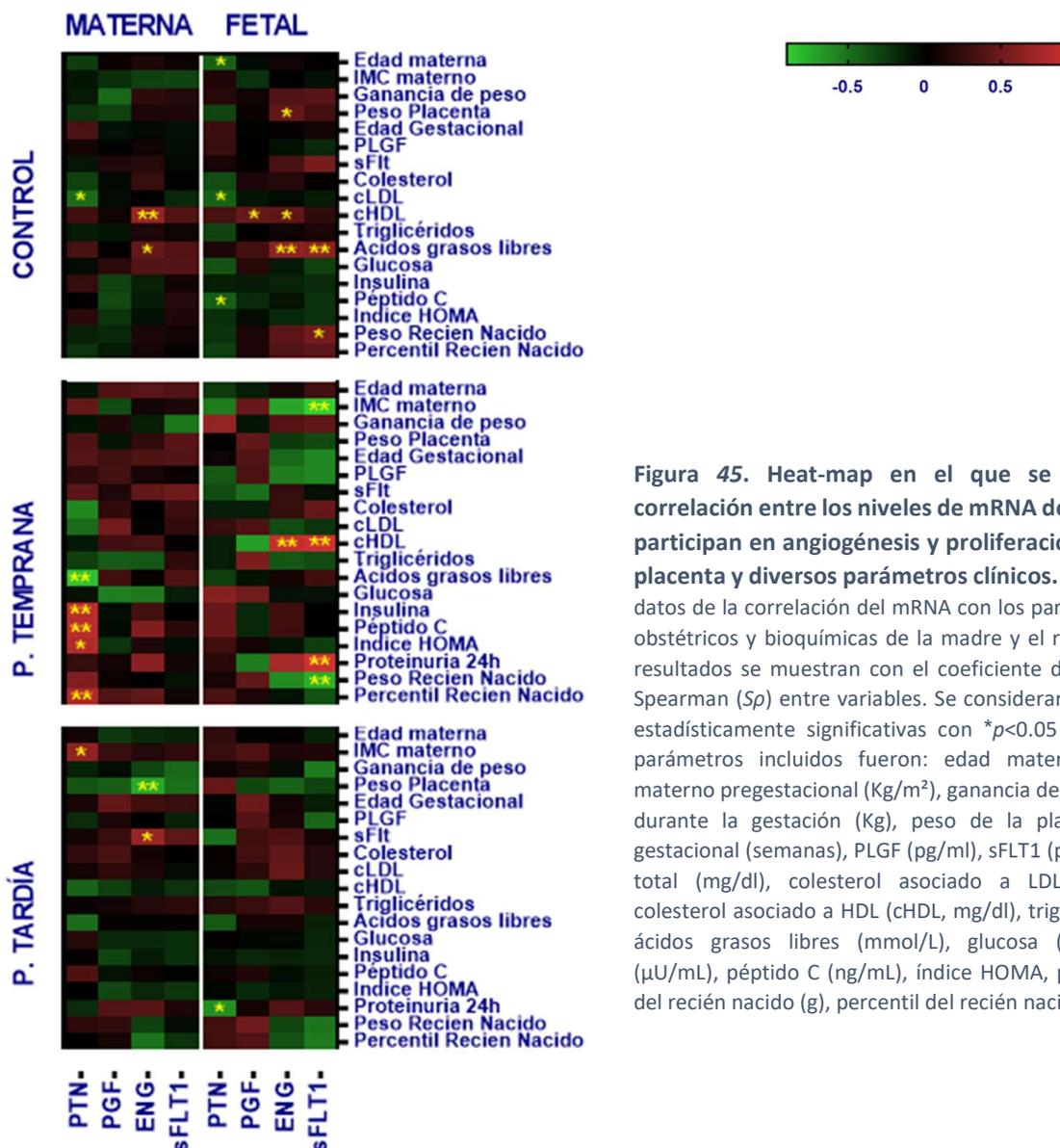


Figura 45. Heat-map en el que se representa la correlación entre los niveles de mRNA de proteínas que participan en angiogénesis y proliferación celular en la placenta y diversos parámetros clínicos. Se analizaron los datos de la correlación del mRNA con los parámetros clínicos, obstétricos y bioquímicos de la madre y el recién nacido, los resultados se muestran con el coeficiente de correlación de Spearman ($S\rho$) entre variables. Se consideraron correlaciones estadísticamente significativas con $*p < 0.05$ y $**p < 0.01$. Los parámetros incluidos fueron: edad materna (años), IMC materno pregestacional (Kg/m^2), ganancia de peso de la mujer durante la gestación (Kg), peso de la placenta (g), edad gestacional (semanas), PLGF (pg/ml), sFLT1 (pg/ml), colesterol total (mg/dl), colesterol asociado a LDL (cLDL, mg/dl), colesterol asociado a HDL (cHDL, mg/dl), triglicéridos (mg/dl), ácidos grasos libres (mmol/L), glucosa (mg/dl), insulina ($\mu\text{U}/\text{mL}$), péptido C (ng/mL), índice HOMA, proteinuria, peso del recién nacido (g), percentil del recién nacido.

Por su parte, la expresión de *ENG* en las placentas control correlaciona positivamente tanto en la cara materna como en la cara fetal con los niveles de colesterol-HDL, así como con los ácidos grasos libres. Además, en la cara fetal también correlaciona positivamente con el peso de la placenta. En las placentas de preeclampsia temprana sólo se observa una correlación de la expresión de *ENG* en la cara fetal de las placentas con los niveles de colesterol-HDL. Por su parte, en las placentas de preeclampsia tardía se observa una correlación negativa entre la expresión de *ENG* en la cara materna y el peso de la placenta y una correlación positiva con los niveles circulantes de sFLT-1 en la madre.

En relación con las moléculas angiogénicas, hemos visto como, la expresión de *PTN* es menor en la cara materna de las placentas procedentes de gestaciones complicadas con preeclampsia de aparición tardía, presentando una disminución en la expresión de casi el 50% respecto de la cara materna del grupo control (**Figura 44.C.**). Mientras la expresión del *PGF*, es menor en la cara fetal de las placentas de la cohorte de mujeres con preeclampsia, respecto a la cara fetal de la cohorte control, siendo la diferencia estadísticamente significativa en la cara fetal de éstas, en concreto en el grupo de la preeclampsia tardía (**Figura 44.D.**). En línea con estos resultados, encontramos en el estudio de correlación (**Figura 45**) que en las placentas control, tanto en la cara materna como en la cara fetal, se observa una correlación negativa de *PTN* con los niveles de colesterol-LDL. Además, en la cara fetal de las placentas control también se observa la correlación en el mismo sentido con la edad materna y el péptido C. En las placentas de preeclampsia temprana a diferencia de los controles, en la cara materna, el mRNA de *PTN* correlaciona negativamente con los ácidos grasos libres y positivamente con la insulina, el péptido C, el índice HOMA y el percentil del recién nacido. En las placentas de preeclampsia tardía solo encontramos asociación positiva de la expresión de *PTN* en la cara materna con el IMC de la gestante previo a la gestación. Por otro lado, como se muestra en la **Figura 45**, la expresión de *PGF* en las placentas control en su cara materna no presenta ninguna correlación, y en la cara fetal únicamente se observa una correlación positiva con el colesterol asociado a HDL. Esta asociación no se encuentra en ningún caso en las placentas procedentes de gestaciones complicadas con preeclampsia.

A diferencia de *PGF* y *PTN* que se encontraban menos expresados en placentas de preeclampsia temprana, tal y como se ha comentado anteriormente, *sFLT1* y *ENG* se encuentran sobreexpresados significativamente en la cara fetal de estas placentas. La relación de *sFLT1* y preeclampsia está ampliamente descrita en la bibliografía. Así, se ha visto que tanto la expresión de *sFLT1* en las placentas con preeclampsia ([Sasagawa, Nagamatsu, Yanagisawa, Fujii, & Shibuya, 2021](#)), como los niveles circulantes del receptor se encuentran aumentados ([Castro et al., 2021](#); [Shibuya, Matsui, Sasagawa, & Nagamatsu, 2021](#)). Por ello sFIT1, junto con el PGF, se utiliza como biomarcador pronóstico de la enfermedad ([H. Yang et al., 2022](#)), además de estudiarse como posible diana terapéutica ([Gubenšek et](#)

al., 2021). Por tanto, nuestros resultados van en línea con lo publicado en la bibliografía, ya que los niveles de expresión son mayores que en placentas control.

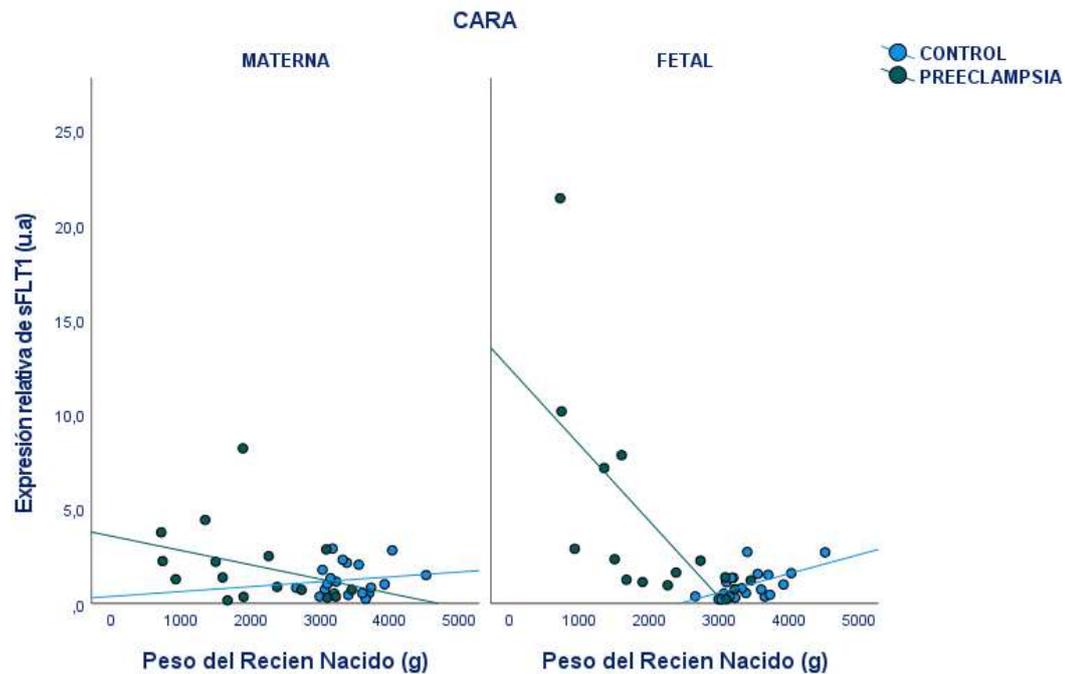


Figura 46. Gráfico de correlación entre la expresión de sFLT1 en la placenta y el peso del recién nacido.

Ahora bien, cuando separamos la cohorte en función del momento de desarrollo de la preeclampsia, pudimos observar cómo el aumento de la expresión de *sFLT1* se debe fundamentalmente al incremento que tiene lugar en las placentas procedentes de preeclampsia temprana, sin haber cambios significativos en la preeclampsia tardía. Y lo que es aún más interesante, en este grupo de gestaciones complicadas con preeclampsia temprana se observa una diferencia muy significativa en la expresión de este factor antiangiogénico entre la cara materna y la cara fetal de la placenta, siendo mayor en la fetal. Nuestros resultados confirman un estudio de 2013 en el que se muestra como la perfusión con sulfato de magnesio aumenta la secreción de sFLT1 en la cara fetal de las placentas con preeclampsia (Eshkoli et al., 2013). Por otra parte, mientras que hemos visto una clara correlación positiva del mRNA de *sFLT1* con el peso del recién nacido en la placenta control, esta asociación es negativa en el caso de la placenta derivada de preeclampsia temprana. Esto supone que a mayor expresión de *sFLT1* en la cara fetal en preeclampsia se asocia a un menor peso del recién nacido, probablemente por una alterada angiogénesis que estaría dificultando la llegada de nutrientes y otras moléculas relevantes al feto. En el caso de ENG se han descrito menores niveles de expresión mientras que de sENG se han descrito niveles más altos (Ball et al., 2009).

Hemos encontrado escasas referencias en la bibliografía en las que se haya relacionado PTN y preeclampsia. En 2009 se observó como PTN participaba en la placentación, sobre todo en etapas tempranas de la gestación, además de participar en la angiogénesis, y como la PTN se expresa de distinta forma en los compartimentos de la placenta (S. Liu, Wang, & Liu, 2018). En 2018 se describió que los

niveles de expresión de *PTN* en la placenta eran menores en un modelo de ratón con preeclampsia respecto a los controles ([Mikelis et al., 2011](#); [Papadimitriou et al., 2016](#); [J. Zhou, Yang, Zhang, Liu, & Dou, 2018](#)). Se ha descrito que *PTN*, además de promover la proliferación celular, actuaría también como un factor proangiogénico ya que promueve la expresión de VEGF ([Parada-Niño, Castillo-León, & Morel, 2022](#); [Robillard, Dekker, Scioscia, & Saito, 2022](#)). En nuestro estudio hemos encontrado una disminución de los niveles del mRNA de *PTN* mayoritariamente en preeclampsia tardía, de forma similar al *PGF*, el otro factor proangiogénico analizado en nuestro estudio. Precisamente, el efecto proangiogénico de *PGF* está ampliamente descrito en la bibliografía, así como el efecto antiangiogénico mencionado con anterioridad de *sENG* y *sFlt1* ([Rowson et al., 2022](#)). De hecho, se ha descrito como en las placentas con preeclampsia los niveles de expresión de *PGF* son más bajos que en las placentas control y los niveles de expresión de *sFLT1* son más altos ([Núñez-Gómez & Lopez-Novoa, 2015](#); [Shahid, Bari, & Hussain, 2022](#)).

Parece por tanto que en las placentas de preeclampsia de aparición temprana el defecto en la angiogénesis está asociado a un aumento de la expresión de factores antiangiogénicos, como *sFLT* y *ENG* mientras que, en las placentas de preeclampsia de aparición tardía, la angiogénesis defectuosa podría estar relacionada con la disminución de los factores angiogénicos, *PGF* y *PTN* en la placenta.

Consideraciones finales:

La preeclampsia de aparición temprana está asociada a un defecto en la placentación provocado por la disfunción de la invasión del trofoblasto, el diagnóstico de esta se produce antes de la semana 34 y está asociada con una mayor tasa de mortalidad fetal y morbilidad materna ([Aneman et al., 2020](#)). Como podemos observar en los datos clínicos, los casos de preeclampsia temprana como es lógico presentan una menor edad gestacional para el parto asociado con un marcado bajo peso al nacer del recién nacido y un peso de la placenta bastante más bajo que en el resto de los grupos. En estas gestantes únicamente se observan mayores niveles de colesterol asociado a HDL.

La preeclampsia de aparición tardía está asociada a un defecto en la remodelación de las arterias espirales que provoca la hipoperfusión sanguínea, sin que se produzca un defecto en la invasión del trofoblasto. Este defecto conduce a una hipoxia placentaria, el estrés oxidativo y el desequilibrio de factores que participan en la angiogénesis, lo que provoca en la gestante los signos y síntomas comentados en la patología, una alteración sistémica del endotelio vascular materno que afecta a distintos órganos. El diagnóstico es posterior a la semana 34 de gestación ([Parada-Niño et al., 2022](#)). En las gestaciones complicadas con preeclampsia de aparición tardía la edad gestacional del parto no es significativamente menor al de las gestantes control, sin embargo, el peso de la placenta y el peso del recién nacido sí son más bajos.

En cuanto a los parámetros clínicos maternos podemos observar cómo estas mujeres presentan mayores niveles de triglicéridos, insulina y péptido C. En relación con los niveles de expresión de proteínas en las placentas hemos encontrado una diferencia en la expresión ENG, PGF, PTN y GPAT4.

Los resultados de nuestro estudio con relación al efecto de la preeclampsia en la expresión génica en la placenta coinciden con lo descrito previamente en la bibliografía, si bien es verdad, que hemos encontrado muy pocos estudios que analicen la diferencia en la expresión de transportadores, nutrientes y enzimas en las distintas caras de la placenta y en función del momento de aparición de la preeclampsia. Con los resultados obtenidos en nuestro trabajo parece que con la preeclampsia se produce una alteración en la expresión de transportadores clave de nutrientes, particularmente en la cara fetal de la placenta, que parece estar asociada a la hipoxia, como un posible mecanismo adaptativo que permite asegurar una suficiente disponibilidad de ATP tanto para la placenta como para el feto. De forma similar, en relación con las enzimas implicadas en el metabolismo lipídico, en términos globales, el nivel de expresión de *LCHAD*, *MCAD*, *ACSL4*, *GPAT4* y *LPIN2* se encuentra disminuido en las placentas con preeclampsia, no observándose en general diferencias muy marcadas entre las caras de la placenta. El mecanismo subyacente a la regulación de la expresión génica de transportadores en placentas con preeclampsia aún no se ha descrito con claridad, sin embargo, se ha visto que tanto HIF-1 α como sFlt1, relacionados con hipoxia y angiogénesis respectivamente, participan en esta regulación ([Chun & Kim, 2021](#); [Vogtmann et al., 2019](#); [H. Zhao et al., 2021](#)).

Este efecto es particularmente evidente en las placentas de preeclampsia de aparición temprana, donde hemos visto un claro incremento de factores antiangiogénicos como sFLT1 o ENG. Este efecto parece específico de la preeclampsia temprana, ya que no se observa en las placentas de preeclampsia tardía, donde parece que es la disminución de los factores angiogénicos los que podrían estar modulando la alterada angiogénesis. Parece que el nivel de expresión de sFLT1 se regula de distinta forma en ambas caras de la placenta siendo mayor en la cara fetal que en la materna. Esto puede contribuir al bajo peso de la placenta y la disfunción de la misma, promoviendo un bajo peso del recién nacido al nacer, que puede además ir en consonancia con la disfunción en el transporte de nutrientes por parte de los transportadores.

4.3 Limitaciones del estudio:

- La edad gestacional tanto en los partos gemelares como en los partos con preeclampsia es más baja que en los sencillos no patológicos. Dado que el análisis de expresión génica se lleva a cabo en las placentas tras el alumbramiento, estas placentas proceden de edades gestacionales diferentes. Si bien es habitual que la edad gestacional sea más baja en este tipo de gestaciones, no podemos descartar que tenga alguna influencia en los resultados de expresión génica.
- Todas las placentas gemelares proceden de FIV y no podemos dilucidar si las diferencias encontradas se deben al hecho de que sean gestaciones gemelares o a cambios debidos a los tratamientos que acompañan a la fecundación *in vitro*.
- En el estudio de los gemelos el número de muestras de este grupo no es alto, por lo que se requieren de estudios posteriores para poder confirmar los resultados obtenidos.
- En el estudio de expresión génica, se han utilizado explantes de placenta pequeños. No podemos descartar que en las placentas de preeclampsia el explante derive de una zona de la placenta que presente un mayor grado de hipoxia o una región fibrótica, y que ello afecte a los datos obtenidos, particularmente en aquellos parámetros que presentan mayor variabilidad.
- En el estudio de expresión génica no se han podido confirmar todos los cambios observados en el mRNA a nivel de proteína, ya que en algunos casos no se disponía de suficiente tejido. En estudios posteriores se planteará la validación de los cambios más importantes encontrados no sólo a nivel de mRNA, sino también de proteína.

5 CONCLUSIONES

1. Los polimorfismos rs10830963 y rs1387153 del receptor de melatonina 1B (*MTNR1B*) presentan con mayor frecuencia el alelo de riesgo en las gestantes con diagnóstico de diabetes gestacional en primer trimestre de gestación, que en las diagnosticadas en el segundo trimestre o en las gestantes sin patología conocida. Por tanto, estos SNP se podrían considerar como candidatos potenciales para su validación como biomarcadores de diabetes gestacional de inicio temprano.
2. El hsa-miR-206 se ha identificado como potencial biomarcador circulante de diabetes gestacional de aparición en el segundo trimestre.
3. Existe un comportamiento diferencial entre las caras de la placenta que se encuentra perfectamente coordinado y que permite acomodar los recursos maternos a la demanda energética fetal, como ocurre en las gestaciones gemelares.
4. En la preeclampsia se produce una alteración en la expresión de transportadores de nutrientes, como *GLUT1* o *GLUT3*, que parece estar asociada a la hipoxia que se produce en esta patología. Este cambio es particularmente importante en la cara fetal de la placenta y podría ser la consecuencia de un posible mecanismo adaptativo para permitir asegurar una suficiente disponibilidad de ATP tanto para la placenta como para el feto.
5. El alterado balance de la angiogénesis que se presenta en la placenta en preeclampsia tiene un diferente origen dependiendo del momento en el que ésta se desarrolla. En las placentas de preeclampsia de aparición temprana, la disminución en la angiogénesis está asociada con un aumento marcado de la expresión de factores antiangiogénicos como *sFLT1*. Este aumento, que es más acusado en la cara fetal de la placenta, podría estar contribuyendo al menor peso corporal de los recién nacidos. Por el contrario, en la preeclampsia de aparición tardía, la alterada angiogénesis se encuentra asociada a la disminución de los factores proangiogénicos, como el *PGF* o *PTN*, sin cambios significativos en la expresión de factores antiangiogénicos.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Abascal-Saiz, A., Fuente-Luelmo, E., Haro, M., de la Calle, M., Ramos-Alvarez, M. P., Perdomo, G., & Bartha, J. L. (2021). Placental Compartmentalization of Lipid Metabolism: Implications for Singleton and Twin Pregnancies. *Reprod Sci*, *28*(4), 1150-1160. doi:10.1007/s43032-020-00385-2
- Abassi, Z., Kinaneh, S., Skarzynski, G., Cinnamon, E., Smith, Y., Bursztyn, M., & Ariel, I. (2020). Aberrant corin and PCSK6 in placentas of the maternal hyperinsulinemia IUGR rat model. *Pregnancy Hypertens*, *21*, 70-76. doi:10.1016/j.preghy.2020.05.007
- Alharbi, K. K., Al-Sulaiman, A. M., Shedaïd, K. M. B., Al-Shangiti, A. M., Marie, M., Al-Sheikh, Y. A., & Ali Khan, I. (2019). MTNR1B genetic polymorphisms as risk factors for gestational diabetes mellitus: a case-control study in a single tertiary care center. *Ann Saudi Med*, *39*(5), 309-318. doi:10.5144/0256-4947.2019.309
- Alvino, G., Cozzi, V., Radaelli, T., Ortega, H., Herrera, E., & Cetin, I. (2008). Maternal and fetal fatty acid profile in normal and intrauterine growth restriction pregnancies with and without preeclampsia. *Pediatr Res*, *64*(6), 615-620. doi:10.1203/PDR.0b013e31818702a2
- American College of Obstetricians and Gynecologists, A. (2020). Gestational Hypertension and Preeclampsia: ACOG Practice Bulletin Summary, Number 222. *Obstet Gynecol*, *135*(6), 1492-1495. doi:10.1097/AOG.0000000000003892
- American Diabetes Association, A. (2021a). 2. Classification and diagnosis of diabetes: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care*, *44*(Supplement 1), S15-S33.
- American Diabetes Association, A. (2021b). 14. Management of diabetes in pregnancy: Standards of Medical Care in Diabetes—2021. *Diabetes Care*, *44*(Supplement 1), S200-S210.
- Aneman, I., Pienaar, D., Suvakov, S., Simic, T. P., Garovic, V. D., & McClements, L. (2020). Mechanisms of Key Innate Immune Cells in Early- and Late-Onset Preeclampsia. *Front Immunol*, *11*, 1864. doi:10.3389/fimmu.2020.01864
- Angehem-Oliveira, M. I., Martins, B. R., Alberton, D., Ramos, E. A. S., Picheth, G., & Rego, F. G. M. (2017). Type 2 diabetes-associated genetic variants of FTO, LEPR, PPAR α , and TCF7L2 in gestational diabetes in a Brazilian population. *Arch Endocrinol Metab*, *61*(3), 238-248. doi:10.1590/2359-3997000000258
- Armaly, Z., Jadaon, J. E., Jabbour, A., & Abassi, Z. A. (2018). Preeclampsia: Novel Mechanisms and Potential Therapeutic Approaches. *Front Physiol*, *9*, 973. doi:10.3389/fphys.2018.00973
- Aryan, L., Medzikovic, L., Umar, S., & Eghbali, M. (2020). Pregnancy-associated cardiac dysfunction and the regulatory role of microRNAs. *Biol Sex Differ*, *11*(1), 14. doi:10.1186/s13293-020-00292-w
- Aulchenko, Y. S., Pullen, J., Kloosterman, W. P., Yazdanpanah, M., Hofman, A., Vaessen, N., . . . van Duijn, C. M. (2007). LPIN2 is associated with type 2 diabetes, glucose metabolism, and body composition. *Diabetes*, *56*(12), 3020-3026. doi:10.2337/db07-0338
- Avnon, T., Ascher-Landsberg, J., Yogeve, Y., & Many, A. (2020). Clinical characteristics of preeclampsia in twin versus singleton pregnancies. *J Matern Fetal Neonatal Med*, 1-5. doi:10.1080/14767058.2020.1784872
- Aydemir, B., Baykara, O., Cinemre, F. B., Cinemre, H., Tuten, A., Kiziler, A. R., . . . Uzun, H. (2016). LOX-1 gene variants and maternal levels of plasma oxidized LDL and malondialdehyde in patients with gestational diabetes mellitus. *Arch Gynecol Obstet*, *293*(3), 517-527. doi:10.1007/s00404-015-3851-6
- Aye, I. L., Jansson, T., & Powell, T. L. (2013). Interleukin-1 β inhibits insulin signaling and prevents insulin-stimulated system A amino acid transport in primary human trophoblasts. *Mol Cell Endocrinol*, *381*(1-2), 46-55. doi:10.1016/j.mce.2013.07.013
- Bakrania, B. A., Spradley, F. T., Drummond, H. A., LaMarca, B., Ryan, M. J., & Granger, J. P. (2020). Preeclampsia: Linking Placental Ischemia with Maternal Endothelial and Vascular Dysfunction. *Compr Physiol*, *11*(1), 1315-1349. doi:10.1002/cphy.c200008
- Balachandiran, M., Bobby, Z., Dorairajan, G., Jacob, S. E., Gladwin, V., Vinayagam, V., & Packirisamy, R. M. (2021). Placental Accumulation of Triacylglycerols in Gestational Diabetes Mellitus and Its Association with Altered Fetal Growth are Related to the Differential Expressions of Proteins of Lipid Metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, *129*(11), 803-812. doi:10.1055/a-1017-3182
- Ball, M., Carmody, M., Wynne, F., Dockery, P., Aigner, A., Cameron, I., . . . Moore, T. (2009). Expression of pleiotrophin and its receptors in human placenta suggests roles in trophoblast life cycle and angiogenesis. *Placenta*, *30*(7), 649-653. doi:10.1016/j.placenta.2009.05.001
- Barbitoff, Y. A., Serebryakova, E. A., Nasykhova, Y. A., Predeus, A. V., Polev, D. E., Shuvalova, A. R., . . . Glotov, A. S. (2018). Identification of Novel Candidate Markers of Type 2 Diabetes and Obesity in Russia by Exome Sequencing with a Limited Sample Size. *Genes (Basel)*, *9*(8). doi:10.3390/genes9080415
- Bartha, J. L., Visiedo, F., Fernández-Deudero, A., Bugatto, F., & Perdomo, G. (2012). Decreased mitochondrial fatty acid oxidation in placentas from women with preeclampsia. *Placenta*, *33*(2), 132-134. doi:10.1016/j.placenta.2011.11.027

- Baumann, M. U., Zamudio, S., & Illsley, N. P. (2007). Hypoxic upregulation of glucose transporters in BeWo choriocarcinoma cells is mediated by hypoxia-inducible factor-1. *Am J Physiol Cell Physiol*, *293*(1), C477-485. doi:10.1152/ajpcell.00075.2007
- Beetch, M., & Alejandro, E. U. (2021). Placental mTOR Signaling and Sexual Dimorphism in Metabolic Health across the Lifespan of Offspring. *Children (Basel)*, *8*(11). doi:10.3390/children8110970
- Bidkhorji, G., Benfeitas, R., Klevstig, M., Zhang, C., Nielsen, J., Uhlen, M., . . . Mardinoglu, A. (2018). Metabolic network-based stratification of hepatocellular carcinoma reveals three distinct tumor subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *115*(50), E11874-e11883. doi:10.1073/pnas.1807305115
- Bonner, C., Nyhan, K. C., Bacon, S., Kyithar, M. P., Schmid, J., Concannon, C. G., . . . Byrne, M. M. (2013). Identification of circulating microRNAs in HNF1A-MODY carriers. *Diabetologia*, *56*(8), 1743-1751. doi:10.1007/s00125-013-2939-4
- Bonomo, J. A., Guan, M., Ng, M. C., Palmer, N. D., Hicks, P. J., Keaton, J. M., . . . Bowden, D. W. (2014). The ras responsive transcription factor RREB1 is a novel candidate gene for type 2 diabetes associated end-stage kidney disease. *Hum Mol Genet*, *23*(24), 6441-6447. doi:10.1093/hmg/ddu362
- Brett, K. E., Ferraro, Z. M., Yockell-Lelievre, J., Gruslin, A., & Adamo, K. B. (2014). Maternal-fetal nutrient transport in pregnancy pathologies: the role of the placenta. *Int J Mol Sci*, *15*(9), 16153-16185. doi:10.3390/ijms150916153
- Brohée, L., Demine, S., Willems, J., Arnould, T., Colige, A. C., & Deroanne, C. F. (2015). Lipin-1 regulates cancer cell phenotype and is a potential target to potentiate rapamycin treatment. *Oncotarget*, *6*(13), 11264-11280. doi:10.18632/oncotarget.3595
- Brown, K., Heller, D. S., Zamudio, S., & Illsley, N. P. (2011). Glucose transporter 3 (GLUT3) protein expression in human placenta across gestation. *Placenta*, *32*(12), 1041-1049. doi:10.1016/j.placenta.2011.09.014
- Bulusu, V., Tumanov, S., Michalopoulou, E., van den Broek, N. J., MacKay, G., Nixon, C., . . . Kamphorst, J. J. (2017). Acetate Recapturing by Nuclear Acetyl-CoA Synthetase 2 Prevents Loss of Histone Acetylation during Oxygen and Serum Limitation. *Cell Rep*, *18*(3), 647-658. doi:10.1016/j.celrep.2016.12.055
- Burton, G. J., & Fowden, A. L. (2015). The placenta: a multifaceted, transient organ. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *370*(1663), 20140066. doi:10.1098/rstb.2014.0066
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., . . . Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*, *55*(4), 611-622. doi:10.1373/clinchem.2008.112797
- Castillo-Castrejon, M., Yamaguchi, K., Rodel, R. L., Erickson, K., Kramer, A., Hirsch, N. M., . . . Powell, T. L. (2021). Effect of type 2 diabetes mellitus on placental expression and activity of nutrient transporters and their association with birth weight and neonatal adiposity. *Mol Cell Endocrinol*, *532*, 111319. doi:10.1016/j.mce.2021.111319
- Castro, K. R., Prado, K. M., Lorenzon, A. R., Hoshida, M. S., Alves, E. A., Francisco, R. P. V., . . . Bevilacqua, E. (2021). Serum From Preeclamptic Women Triggers Endoplasmic Reticulum Stress Pathway and Expression of Angiogenic Factors in Trophoblast Cells. *Front Physiol*, *12*, 799653. doi:10.3389/fphys.2021.799653
- Catalano, P. M., Huston, L., Amini, S. B., & Kalhan, S. C. (1999). Longitudinal changes in glucose metabolism during pregnancy in obese women with normal glucose tolerance and gestational diabetes mellitus. *American journal of obstetrics and gynecology*, *180*(4), 903-916.
- Chaiworapongsa, T., Chaemsaitong, P., Korzeniewski, S. J., Yeo, L., & Romero, R. (2014). Pre-eclampsia part 2: prediction, prevention and management. *Nat Rev Nephrol*, *10*(9), 531-540. doi:10.1038/nrneph.2014.103
- Chang, Y. L., Chao, A. S., Chang, S. D., & Cheng, P. J. (2021). Placental glucose transporter 1 and 3 gene expression in Monochorionic twin pregnancies with selective fetal growth restriction. *BMC Pregnancy Childbirth*, *21*(1), 260. doi:10.1186/s12884-021-03744-2
- Chen, L., Duan, Y., Wei, H., Ning, H., Bi, C., Zhao, Y., . . . Li, Y. (2019). Acetyl-CoA carboxylase (ACC) as a therapeutic target for metabolic syndrome and recent developments in ACC1/2 inhibitors. *Expert Opin Investig Drugs*, *28*(10), 917-930. doi:10.1080/13543784.2019.1657825
- Chen, Y., Rui, B. B., Tang, L. Y., & Hu, C. M. (2015). Lipin family proteins--key regulators in lipid metabolism. *Ann Nutr Metab*, *66*(1), 10-18. doi:10.1159/000368661
- Chengmao, X., Li, L., Yan, L., Jie, Y., Xiaoju, W., Xiaohui, C., & Huimin, G. (2017). ABCA1 affects placental function via trophoblast and macrophage. *Life Sci*, *191*, 150-156. doi:10.1016/j.lfs.2017.10.031
- Cho, Y. M., Kim, T. H., Lim, S., Choi, S. H., Shin, H. D., Lee, H. K., . . . Jang, H. C. (2009). Type 2 diabetes-associated genetic variants discovered in the recent genome-wide association studies are related to gestational diabetes mellitus in the Korean population. *Diabetologia*, *52*(2), 253-261. doi:10.1007/s00125-008-1196-4
- Chu, C. A., Wang, Y. W., Chen, Y. L., Chen, H. W., Chuang, J. J., Chang, H. Y., . . . Lee, C. T. (2021). The Role of Phosphatidylinositol 3-Kinase Catalytic Subunit Type 3 in the Pathogenesis of Human Cancer. *Int J Mol Sci*, *22*(20). doi:10.3390/ijms222010964

- Chun, Y., & Kim, J. (2021). AMPK-mTOR Signaling and Cellular Adaptations in Hypoxia. *Int J Mol Sci*, 22(18). doi:10.3390/ijms22189765
- Cindrova-Davies, T., Herrera, E. A., Niu, Y., Kingdom, J., Giussani, D. A., & Burton, G. J. (2013). Reduced cystathionine γ -lyase and increased miR-21 expression are associated with increased vascular resistance in growth-restricted pregnancies: hydrogen sulfide as a placental vasodilator. *Am J Pathol*, 182(4), 1448-1458. doi:10.1016/j.ajpath.2013.01.001
- Cohen, M., & Bischof, P. (2007). Factors regulating trophoblast invasion. *Gynecol Obstet Invest*, 64(3), 126-130. doi:10.1159/000101734
- Dalfrà, M. G., Burlina, S., Del Vecovo, G. G., & Lapolla, A. (2020). Genetics and Epigenetics: New Insight on Gestational Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 11, 602477. doi:10.3389/fendo.2020.602477
- Damiano, A. E. (2020). Aquaporins during pregnancy. *Vitam Horm*, 112, 327-355. doi:10.1016/bs.vh.2019.08.009
- De la Calle, M., Bartha, J. L., García, L., Cuerva, M. J., & Ramiro-Cortijo, D. (2021). Women Aged over 40 with Twin Pregnancies Have a Higher Risk of Adverse Obstetrical Outcomes. *Int J Environ Res Public Health*, 18(24). doi:10.3390/ijerph182413117
- de Melo, S. F., Frigeri, H. R., dos Santos-Weiss, I. C., Réa, R. R., de Souza, E. M., Alberton, D., . . . Picheth, G. (2015). Polymorphisms in FTO and TCF7L2 genes of Euro-Brazilian women with gestational diabetes. *Clin Biochem*, 48(16-17), 1064-1067. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.06.013
- Deng, Y. N., Xia, Z., Zhang, P., Ejaz, S., & Liang, S. (2020). Transcription Factor RREB1: from Target Genes towards Biological Functions. *Int J Biol Sci*, 16(8), 1463-1473. doi:10.7150/ijbs.40834
- Dias, S., Pheiffer, C., Abrahams, Y., Rheeder, P., & Adam, S. (2018). Molecular Biomarkers for Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*, 19(10). doi:10.3390/ijms19102926
- Ding, H., Ding, Z., Zhao, M., Ji, B., Lei, J., Chen, J., . . . Gao, Q. (2022). Correlation of amniotic fluid index and placental aquaporin 1 levels in terms of preeclampsia. *Placenta*, 117, 169-178. doi:10.1016/j.placenta.2021.12.010
- Ding, M., Chavarro, J., Olsen, S., Lin, Y., Ley, S. H., Bao, W., . . . Zhang, C. (2018). Genetic variants of gestational diabetes mellitus: a study of 112 SNPs among 8722 women in two independent populations. *Diabetologia*, 61(8), 1758-1768. doi:10.1007/s00125-018-4637-8
- Ding, X., Yang, Z., Han, Y., & Yu, H. (2014a). Fatty acid oxidation changes and the correlation with oxidative stress in different preeclampsia-like mouse models. *PLoS One*, 9(10), e109554. doi:10.1371/journal.pone.0109554
- Ding, X., Yang, Z., Han, Y., & Yu, H. (2014b). Long-chain fatty acid oxidation changes in a β 2 glycoprotein I-induced preeclampsia-like mouse model. *Placenta*, 35(6), 392-397. doi:10.1016/j.placenta.2014.03.013
- Ding, X., Yang, Z., Han, Y., & Yu, H. (2015). Correlation of long-chain fatty acid oxidation with oxidative stress and inflammation in pre-eclampsia-like mouse models. *Placenta*, 36(12), 1442-1449. doi:10.1016/j.placenta.2015.10.014
- Dłuski, D. F., Wolińska, E., & Skrzypczak, M. (2021). Epigenetic Changes in Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*, 22(14). doi:10.3390/ijms22147649
- Dong, J., Wen, L., Guo, X., Xiao, X., Jiang, F., Li, B., . . . Wang, X. (2019). The increased expression of glucose transporters in human full-term placentas from assisted reproductive technology without changes of mTOR signaling. *Placenta*, 86, 4-10. doi:10.1016/j.placenta.2019.08.087
- Du, P., Wang, J., Han, Y., & Feng, J. (2020). Blocking the LncRNA MALAT1/miR-224-5p/NLRP3 Axis Inhibits the Hippocampal Inflammatory Response in T2DM With OSA. *Front Cell Neurosci*, 14, 97. doi:10.3389/fncel.2020.00097
- Duan, F. M., Fu, L. J., Wang, Y. H., Adu-Gyamfi, E. A., Ruan, L. L., Xu, Z. W., . . . Ding, Y. B. (2021). THBS1 regulates trophoblast fusion through a CD36-dependent inhibition of cAMP, and its upregulation participates in preeclampsia. *Genes Dis*, 8(3), 353-363. doi:10.1016/j.gendis.2020.05.007
- Ducza, E., Csányi, A., & Gáspár, R. (2017). Aquaporins during Pregnancy: Their Function and Significance. *Int J Mol Sci*, 18(12). doi:10.3390/ijms18122593
- Duttaroy, A. K. (2009). Transport of fatty acids across the human placenta: a review. *Prog Lipid Res*, 48(1), 52-61. doi:10.1016/j.plipres.2008.11.001
- Eckstein, M. L., Moser, O., Rössler, A., Moertl, M. G., Jantscher, A., Papousek, I., . . . Lackner, H. K. (2021). Differences in Hemodynamic, Hormonal and Heart Rate Variability Parameters in Complication-Free Pregnancies Compared to Individuals with Gestational Diabetes Mellitus and Preeclampsia: An Observational Retrospective Analysis. *Life (Basel)*, 11(7). doi:10.3390/life11070626
- Ekelund, M., Shaat, N., Almgren, P., Anderberg, E., Landin-Olsson, M., Lyssenko, V., . . . Berntorp, K. (2012). Genetic prediction of postpartum diabetes in women with gestational diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract*, 97(3), 394-398. doi:10.1016/j.diabres.2012.04.020

- Eshkoli, T., Holcberg, G., Bronfenmacher, B., Amash, A., Huleihel, M., & Erez, O. (2013). Perfusion with magnesium sulfate increases sFlt-1 secretion only in the fetal side of placenta of women with preeclampsia. *J Matern Fetal Neonatal Med*, *26*(2), 116-122. doi:10.3109/14767058.2012.722725
- Fallucca, F., Dalfrà, M. G., Sciuillo, E., Masin, M., Buongiorno, A. M., Napoli, A., . . . Lapolla, A. (2006). Polymorphisms of insulin receptor substrate 1 and beta3-adrenergic receptor genes in gestational diabetes and normal pregnancy. *Metabolism*, *55*(11), 1451-1456. doi:10.1016/j.metabol.2006.06.004
- Forbes, K., & Westwood, M. (2010). Maternal growth factor regulation of human placental development and fetal growth. *J Endocrinol*, *207*(1), 1-16. doi:10.1677/JOE-10-0174
- Founds, S. A., Tsigas, E., Ren, D., & Barmada, M. M. (2018). Associating Symptom Phenotype and Genotype in Preeclampsia. *Biol Res Nurs*, *20*(2), 126-136. doi:10.1177/1099800417754140
- Franzago, M., Fraticelli, F., Nicolucci, A., Celentano, C., Liberati, M., Stuppia, L., & Vitacolonna, E. (2017). Molecular Analysis of a Genetic Variants Panel Related to Nutrients and Metabolism: Association with Susceptibility to Gestational Diabetes and Cardiometabolic Risk in Affected Women. *J Diabetes Res*, *2017*, 4612623. doi:10.1155/2017/4612623
- Fuenzalida, B., Cantin, C., Kallol, S., Carvajal, L., Pastén, V., Contreras-Duarte, S., . . . Leiva, A. (2020). Cholesterol uptake and efflux are impaired in human trophoblast cells from pregnancies with maternal supraphysiological hypercholesterolemia. *Sci Rep*, *10*(1), 5264. doi:10.1038/s41598-020-61629-4
- Furuya, T. K., Murta, C. B., Murillo Carrasco, A. G., Uno, M., Sicherer, L., Villa, L. L., . . . Pontes, J., Jr. (2021). Disruption of miRNA-mRNA Networks Defines Novel Molecular Signatures for Penile Carcinogenesis. *Cancers (Basel)*, *13*(19). doi:10.3390/cancers13194745
- Galli, M., Hameed, A., Żbikowski, A., & Zabielski, P. (2021). Aquaporins in insulin resistance and diabetes: More than channels! *Redox Biol*, *44*, 102027. doi:10.1016/j.redox.2021.102027
- Gao, X., Lin, S. H., Ren, F., Li, J. T., Chen, J. J., Yao, C. B., . . . Lei, Q. Y. (2016). Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia. *Nat Commun*, *7*, 11960. doi:10.1038/ncomms11960
- Gerber, P. A., & Rutter, G. A. (2017). The Role of Oxidative Stress and Hypoxia in Pancreatic Beta-Cell Dysfunction in Diabetes Mellitus. *Antioxid Redox Signal*, *26*(10), 501-518. doi:10.1089/ars.2016.6755
- Grotenfelt, N. E., Wasenius, N. S., Rönö, K., Laivuori, H., Stach-Lempinen, B., Orho-Melander, M., . . . Eriksson, J. G. (2016). Interaction between rs10830963 polymorphism in MTNR1B and lifestyle intervention on occurrence of gestational diabetes. *Diabetologia*, *59*(8), 1655-1658. doi:10.1007/s00125-016-3989-1
- Guarino, E., Delli Poggi, C., Grieco, G. E., Cenci, V., Ceccarelli, E., Crisci, I., . . . Dotta, F. (2018). Circulating MicroRNAs as Biomarkers of Gestational Diabetes Mellitus: Updates and Perspectives. *Int J Endocrinol*, *2018*, 6380463. doi:10.1155/2018/6380463
- Gubenšek, J., Ponikvar, R., Premru Sršen, T., Fabjan Vodusek, V., Moertl, M. G., & Lučovnik, M. (2021). Treatment of preeclampsia at extremely preterm gestation with therapeutic plasma exchange. *Clin Nephrol*, *96*(1), 101-106. doi:10.5414/cnp96s18
- Gude, N. M., Roberts, C. T., Kalionis, B., & King, R. G. (2004). Growth and function of the normal human placenta. *Thromb Res*, *114*(5-6), 397-407. doi:10.1016/j.thromres.2004.06.038
- Guerby, P., Tasta, O., Swiader, A., Pont, F., Bujold, E., Parant, O., . . . Negre-Salvayre, A. (2021). Role of oxidative stress in the dysfunction of the placental endothelial nitric oxide synthase in preeclampsia. *Redox Biol*, *40*, 101861. doi:10.1016/j.redox.2021.101861
- Gutierrez, L. S., & Gutierrez, J. (2021). Thrombospondin 1 in Metabolic Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *12*, 638536. doi:10.3389/fendo.2021.638536
- Hadden, D. R., & McLaughlin, C. (2009). Normal and abnormal maternal metabolism during pregnancy. *Semin Fetal Neonatal Med*, *14*(2), 66-71. doi:10.1016/j.siny.2008.09.004
- Han, Y., Yang, Z., Ding, X., Yu, H., & Yi, Y. (2015). [Expression of long chain fatty acid oxidase in maternal and fetal tissues in preeclampsia-like mouse model in mid-gestation]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, *95*(1), 26-29.
- Hara, K., Fujita, H., Johnson, T. A., Yamauchi, T., Yasuda, K., Horikoshi, M., . . . Kadowaki, T. (2014). Genome-wide association study identifies three novel loci for type 2 diabetes. *Hum Mol Genet*, *23*(1), 239-246. doi:10.1093/hmg/ddt399
- Harris, T. E., & Finck, B. N. (2011). Dual function lipin proteins and glycerolipid metabolism. *Trends Endocrinol Metab*, *22*(6), 226-233. doi:10.1016/j.tem.2011.02.006
- Herrera, E. (1978). Metabolismo intermediario durante el embarazo. *Invest Cien*, *4*, 14-24.
- Herrera, E. (1988). Aspectos básicos de las adaptaciones metabólicas en la madre durante la gestación y relaciones materno-fetales. *Bioquímica perinatal. Fundación Areces, Ceura*, 17-39.
- Herrera, E. (1999). *Metabolismo en el embarazo. "Tratado de nutrición" M. Hernández Rodríguez y A. Sastre Gallego*: Ediciones Díaz de Santos.
- Herrera, E. (2000). Metabolic adaptations in pregnancy and their implications for the availability of substrates to the fetus. *European journal of clinical nutrition*, *54*(1), S47-S51.

- Herrera, E., Amusquivar, E., López-Soldado, I., & Ortega, H. (2006). Maternal lipid metabolism and placental lipid transfer. *Horm Res*, *65 Suppl 3*, 59-64. doi:10.1159/000091507
- Herrera, E., & Ortega-Senovilla, H. (2014). Lipid metabolism during pregnancy and its implications for fetal growth. *Curr Pharm Biotechnol*, *15*(1), 24-31. doi:10.2174/1389201015666140330192345
- Herrera, E., Palacin, M., Martin, A., & Lasuncion, M. A. (1985). Relationship between maternal and fetal fuels and placental glucose transfer in rats with maternal diabetes of varying severity. *Diabetes*, *34*(Supplement 2), 42-46.
- Holwerda, K. M., Bos, E. M., Rajakumar, A., Ris-Stalpers, C., van Pampus, M. G., Timmer, A., . . . Lely, A. T. (2012). Hydrogen sulfide producing enzymes in pregnancy and preeclampsia. *Placenta*, *33*(6), 518-521. doi:10.1016/j.placenta.2012.02.014
- Hong, K., Kim, S. H., Cha, D. H., & Park, H. J. (2021). Defective Uteroplacental Vascular Remodeling in Preeclampsia: Key Molecular Factors Leading to Long Term Cardiovascular Disease. *Int J Mol Sci*, *22*(20). doi:10.3390/ijms222011202
- Hu, T., Wang, G., Zhu, Z., Huang, Y., Gu, H., & Ni, X. (2015). Increased ADAM10 expression in preeclamptic placentas is associated with decreased expression of hydrogen sulfide production enzymes. *Placenta*, *36*(8), 947-950. doi:10.1016/j.placenta.2015.05.007
- Hu, T. X., Wang, G., Guo, X. J., Sun, Q. Q., He, P., Gu, H., . . . Ni, X. (2016). MiR 20a,-20b and -200c are involved in hydrogen sulfide stimulation of VEGF production in human placental trophoblasts. *Placenta*, *39*, 101-110. doi:10.1016/j.placenta.2016.01.019
- Hua, Y., Jiang, W., Zhang, W., Shen, Q., Chen, M., & Zhu, X. (2013). Expression and significance of aquaporins during pregnancy. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *18*, 1373-1383. doi:10.2741/4186
- Huai, J., Yang, Z., Yi, Y. H., & Wang, G. J. (2019). Role of mammalian target of rapamycin signaling pathway in regulation of fatty acid oxidation in a preeclampsia-like mouse model treated with pravastatin. *Chin Med J (Engl)*, *132*(6), 671-679. doi:10.1097/cm9.000000000000129
- Huai, J., Yang, Z., Yi, Y. H., Wang, G. J., & Xiang, Q. Q. (2018). [Regulation of pravastatin on long-chain fatty acid oxidative enzyme in pre-eclampsia-like mouse model]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, *53*(3), 183-189. doi:10.3760/cma.j.issn.0529-567X.2018.03.008
- Huang, X., Anderle, P., Hostettler, L., Baumann, M. U., Surbek, D. V., Ontsouka, E. C., & Albrecht, C. (2018). Identification of placental nutrient transporters associated with intrauterine growth restriction and pre-eclampsia. *BMC Genomics*, *19*(1), 173. doi:10.1186/s12864-018-4518-z
- Iacocca, M. A., Wang, J., Dron, J. S., Robinson, J. F., McIntyre, A. D., Cao, H., & Hegele, R. A. (2017). Use of next-generation sequencing to detect LDLR gene copy number variation in familial hypercholesterolemia. *J Lipid Res*, *58*(11), 2202-2209. doi:10.1194/jlr.D079301
- Iannone, F., Montesanto, A., Cione, E., Crocco, P., Caroleo, M. C., Dato, S., . . . Passarino, G. (2020). Expression Patterns of Muscle-Specific miR-133b and miR-206 Correlate with Nutritional Status and Sarcopenia. *Nutrients*, *12*(2). doi:10.3390/nu12020297
- Ibdah, J. A., Dasouki, M. J., & Strauss, A. W. (1999). Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: variable expressivity of maternal illness during pregnancy and unusual presentation with infantile cholestasis and hypocalcaemia. *J Inherit Metab Dis*, *22*(7), 811-814. doi:10.1023/a:1005506024055
- Imperio, G. E., Javam, M., Lye, P., Constantinof, A., Dunk, C. E., Reis, F. M., . . . Bloise, E. (2019). Gestational age-dependent gene expression profiling of ATP-binding cassette transporters in the healthy human placenta. *J Cell Mol Med*, *23*(1), 610-618. doi:10.1111/jcmm.13966
- Jadoon, A., Cunningham, P., & McDermott, L. C. (2015). Regulation of fatty acid binding proteins by hypoxia inducible factors 1 α and 2 α in the placenta: relevance to pre-eclampsia. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, *93*, 25-29. doi:10.1016/j.plefa.2014.09.004
- James-Allan, L. B., Teal, S., Powell, T. L., & Jansson, T. (2020). Changes in Placental Nutrient Transporter Protein Expression and Activity Across Gestation in Normal and Obese Women. *Reprod Sci*, *27*(9), 1758-1769. doi:10.1007/s43032-020-00173-y
- Janzen, C., Lei, M. Y., Cho, J., Sullivan, P., Shin, B. C., & Devaskar, S. U. (2013). Placental glucose transporter 3 (GLUT3) is up-regulated in human pregnancies complicated by late-onset intrauterine growth restriction. *Placenta*, *34*(11), 1072-1078. doi:10.1016/j.placenta.2013.08.010
- Jena, M. K., Sharma, N. R., Petitt, M., Maulik, D., & Nayak, N. R. (2020). Pathogenesis of Preeclampsia and Therapeutic Approaches Targeting the Placenta. *Biomolecules*, *10*(6). doi:10.3390/biom10060953
- Jia, K. G., Feng, G., Tong, Y. S., Tao, G. Z., & Xu, L. (2020). miR-206 regulates non-small-cell lung cancer cell aerobic glycolysis by targeting hexokinase 2. *J Biochem*, *167*(4), 365-370. doi:10.1093/jb/mvz099
- Jia, Y., Shen, Y., Shi, X., Gu, X., Zhang, P., Liu, Y., . . . Jiang, L. (2020). MTNR1B gene on susceptibility to gestational diabetes mellitus: a two-stage hospital-based study in Southern China. *Mol Genet Genomics*, *295*(6), 1369-1378. doi:10.1007/s00438-020-01706-5

- Johnsen, G. M., Weedon-Fekjaer, M. S., Tobin, K. A., Staff, A. C., & Duttaroy, A. K. (2009). Long-chain polyunsaturated fatty acids stimulate cellular fatty acid uptake in human placental choriocarcinoma (BeWo) cells. *Placenta*, *30*(12), 1037-1044. doi:10.1016/j.placenta.2009.10.004
- Joshi, N. P., Mane, A. R., Sahay, A. S., Sundrani, D. P., Joshi, S. R., & Yajnik, C. S. (2021). Role of Placental Glucose Transporters in Determining Fetal Growth. *Reprod Sci*. doi:10.1007/s43032-021-00699-9
- Kallol, S., Huang, X., Müller, S., Ontsouka, C. E., & Albrecht, C. (2018). Novel Insights into Concepts and Directionality of Maternal-Fetal Cholesterol Transfer across the Human Placenta. *Int J Mol Sci*, *19*(8). doi:10.3390/ijms19082334
- Kanthimathi, S., Chidambaram, M., Liju, S., Bhavadharini, B., Bodhini, D., Prakash, V. G., . . . Radha, V. (2015). Identification of Genetic Variants of Gestational Diabetes in South Indians. *Diabetes Technol Ther*, *17*(7), 462-467. doi:10.1089/dia.2014.0349
- Khaire, A. A., Thakar, S. R., Wagh, G. N., & Joshi, S. R. (2021). Placental lipid metabolism in preeclampsia. *J Hypertens*, *39*(1), 127-134. doi:10.1097/hjh.0000000000002596
- Kim, E., Kwak, S. H., Chung, H. R., Ohn, J. H., Bae, J. H., Choi, S. H., . . . Jang, H. C. (2017). DNA methylation profiles in sibling pairs discordant for intrauterine exposure to maternal gestational diabetes. *Epigenetics*, *12*(10), 825-832. doi:10.1080/15592294.2017.1370172
- Kjaergaard, A. D., Wu, Y., Ming, W. K., Wang, Z., Kjaergaard, M. N., & Ellervik, C. (2022). Homocysteine and female fertility, pregnancy loss and offspring birthweight: a two-sample Mendelian randomization study. *Eur J Clin Nutr*, *76*(1), 40-47. doi:10.1038/s41430-021-00898-2
- Klein, K., Haslinger, P., Bancher-Todesca, D., Leipold, H., Knöfler, M., Handisurya, A., . . . Worda, C. (2012). Transcription factor 7-like 2 gene polymorphisms and gestational diabetes mellitus. *J Matern Fetal Neonatal Med*, *25*(9), 1783-1786. doi:10.3109/14767058.2012.663831
- Knöfler, M. (2010). Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int J Dev Biol*, *54*(2-3), 269-280. doi:10.1387/ijdb.082769mk
- Knöfler, M., & Pollheimer, J. (2013). Human placental trophoblast invasion and differentiation: a particular focus on Wnt signaling. *Front Genet*, *4*, 190. doi:10.3389/fgene.2013.00190
- Kolahi, K., Louey, S., Varlamov, O., & Thornburg, K. (2016). Real-Time Tracking of BODIPY-C12 Long-Chain Fatty Acid in Human Term Placenta Reveals Unique Lipid Dynamics in Cytotrophoblast Cells. *PLoS One*, *11*(4), e0153522. doi:10.1371/journal.pone.0153522
- Kopylov, A. T., Papyshva, O., Gribova, I., Kotaysch, G., Kharitonova, L., Mayatskaya, T., . . . Morozov, S. G. (2020). Molecular pathophysiology of diabetes mellitus during pregnancy with antenatal complications. *Sci Rep*, *10*(1), 19641. doi:10.1038/s41598-020-76689-9
- Korb, D., Schmitz, T., Seco, A., Goffinet, F., Deneux-Tharoux, C., group, J. U. M. d. A. s., & the Groupe de Recherche en Obstetrique et, G. (2020). Risk factors and high-risk subgroups of severe acute maternal morbidity in twin pregnancy: A population-based study. *PLoS One*, *15*(2), e0229612. doi:10.1371/journal.pone.0229612
- Koundouros, N., & Poulgiannis, G. (2020). Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *Br J Cancer*, *122*(1), 4-22. doi:10.1038/s41416-019-0650-z
- Koutsoulidou, A., Kyriakides, T. C., Papadimas, G. K., Christou, Y., Kararizou, E., Papanicolaou, E. Z., & Phylactou, L. A. (2015). Elevated Muscle-Specific miRNAs in Serum of Myotonic Dystrophy Patients Relate to Muscle Disease Progress. *PLoS One*, *10*(4), e0125341. doi:10.1371/journal.pone.0125341
- Kuasne, H., Barros-Filho, M. C., Busso-Lopes, A., Marchi, F. A., Pinheiro, M., Muñoz, J. J., . . . Rogatto, S. R. (2017). Integrative miRNA and mRNA analysis in penile carcinomas reveals markers and pathways with potential clinical impact. *Oncotarget*, *8*(9), 15294-15306. doi:10.18632/oncotarget.14783
- Kvetnoy, I., Ivanov, D., Mironova, E., Evsyukova, I., Nasyrov, R., Kvetnaia, T., & Polyakova, V. (2022). Melatonin as the Cornerstone of Neuroimmunoendocrinology. *Int J Mol Sci*, *23*(3). doi:10.3390/ijms23031835
- Lager, S., & Powell, T. L. (2012). Regulation of nutrient transport across the placenta. *J Pregnancy*, *2012*, 179827. doi:10.1155/2012/179827
- Lager, S., Ramirez, V. I., Gaccioli, F., Jang, B., Jansson, T., & Powell, T. L. (2016). Protein expression of fatty acid transporter 2 is polarized to the trophoblast basal plasma membrane and increased in placentas from overweight/obese women. *Placenta*, *40*, 60-66. doi:10.1016/j.placenta.2016.02.010
- Lain, K. Y., & Catalano, P. M. (2007). Metabolic changes in pregnancy. *Clin Obstet Gynecol*, *50*(4), 938-948. doi:10.1097/GRF.0b013e31815a5494
- Laine, K., Murzakanova, G., Sole, K. B., Pay, A. D., Heradstveit, S., & Raisanen, S. (2019). Prevalence and risk of preeclampsia and gestational hypertension in twin pregnancies: a population-based register study. *BMJ Open*, *9*(7), e029908. doi:10.1136/bmjopen-2019-029908

- Langdown, M. L., & Sugden, M. C. (2001). Enhanced placental GLUT1 and GLUT3 expression in dexamethasone-induced fetal growth retardation. *Mol Cell Endocrinol*, *185*(1-2), 109-117. doi:10.1016/s0303-7207(01)00629-3
- LaPierre, M. P., & Stoffel, M. (2017). MicroRNAs as stress regulators in pancreatic beta cells and diabetes. *Mol Metab*, *6*(9), 1010-1023. doi:10.1016/j.molmet.2017.06.020
- Leng, L., Zhang, C., Ren, L., & Li, Q. (2019). Construction of a long non-coding RNA-mediated competitive endogenous RNA network reveals global patterns and regulatory markers in gestational diabetes. *Int J Mol Med*, *43*(2), 927-935. doi:10.3892/ijmm.2018.4026
- Li, E. Q., Zhao, W., Zhang, C., Qin, L. Z., Liu, S. J., Feng, Z. Q., . . . Chen, C. P. (2019). Synthesis and anti-cancer activity of ND-646 and its derivatives as acetyl-CoA carboxylase 1 inhibitors. *Eur J Pharm Sci*, *137*, 105010. doi:10.1016/j.ejps.2019.105010
- Li, F., Yang, Z., Zhang, A., Sun, X., Wang, J., & Meng, R. (2015). [The changes of LCHAD in preeclampsia with different clinical features and the correlation with NADPH P47-phox, p38MAPK- α , COX-2 and serum FFA and TG]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, *50*(2), 92-100.
- Li, L. X., Liu, Y. L., Wen, J. G., Li, Z. Z., & Zhao, Y. P. (2008). [Expression and significance of aquaporin 1 in placenta, placental membranes and peritoneum of patients with hypertensive disorder complicating pregnancy]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, *43*(7), 497-501.
- Li, Y., & Liu, J. (2020). MicroRNA-206 predicts raised fetal growth retardation risk through the interaction with vascular endothelial growth factor in pregnancies. *Medicine (Baltimore)*, *99*(7), e18897. doi:10.1097/md.00000000000018897
- Liang, G., Wu, Y., Guan, Y., Dong, Y., Jiang, L., Mao, G., . . . Tang, J. (2020). The correlations between the serum expression of miR-206 and the severity and prognosis of sepsis. *Ann Palliat Med*, *9*(5), 3222-3234. doi:10.21037/apm-20-1391
- Lien, Y. C., Zhang, Z., Cheng, Y., Polyak, E., Sillers, L., Falk, M. J., . . . Simmons, R. A. (2021). Human Placental Transcriptome Reveals Critical Alterations in Inflammation and Energy Metabolism with Fetal Sex Differences in Spontaneous Preterm Birth. *Int J Mol Sci*, *22*(15). doi:10.3390/ijms22157899
- Lin, Z., Wang, Y., Zhang, B., & Jin, Z. (2018). Association of type 2 diabetes susceptible genes GCKR, SLC30A8, and FTO polymorphisms with gestational diabetes mellitus risk: a meta-analysis. *Endocrine*, *62*(1), 34-45. doi:10.1007/s12020-018-1651-z
- Lisonkova, S., Sabr, Y., Mayer, C., Young, C., Skoll, A., & Joseph, K. S. (2014). Maternal morbidity associated with early-onset and late-onset preeclampsia. *Obstet Gynecol*, *124*(4), 771-781. doi:10.1097/AOG.0000000000000472
- Liu, J., Song, G., Zhao, G., & Meng, T. (2020). Lack of association between IGF2BP2 rs4402960 polymorphism and gestational diabetes mellitus: a case-control study, meta-analysis and trial sequential analysis. *Biosci Rep*, *40*(7). doi:10.1042/bsr20200990
- Liu, Q., Huang, Z., Li, H., Bai, J., Liu, X., & Ye, H. (2016). Relationship between melatonin receptor 1B (rs10830963 and rs1387153) with gestational diabetes mellitus: a case-control study and meta-analysis. *Arch Gynecol Obstet*, *294*(1), 55-61. doi:10.1007/s00404-015-3948-y
- Liu, R., Zheng, S., Peng, S., Yu, Y., Fang, J., Tan, S., . . . Shao, Y. (2020). Prognostic Value and Clinicopathological Features of MicroRNA-206 in Various Cancers: A Meta-Analysis. *Biomed Res Int*, *2020*, 2159704. doi:10.1155/2020/2159704
- Liu, S., Wang, F., & Liu, G. (2018). Knockdown of pleiotrophin increases the risk of preeclampsia following vitrified-thawed embryo transfer. *Int J Oncol*, *53*(5), 1847-1856. doi:10.3892/ijo.2018.4540
- Liu, Y., Ren, M., Bi, X., Fu, Y., Jing, X., Zhang, H., . . . Wang, C. (2021). A systematic review on the application of vascular endothelial growth factors in preeclampsia. *Ann Palliat Med*, *10*(8), 9259-9266. doi:10.21037/apm-21-2109
- London, S., De Franco, E., Elias-Assad, G., Barhoum, M. N., Felszer, C., Paniakov, M., . . . Tenenbaum-Rakover, Y. (2021). Case Report: Neonatal Diabetes Mellitus Caused by a Novel GLIS3 Mutation in Twins. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *12*, 673755. doi:10.3389/fendo.2021.673755
- Lorenzo-Almorós, A., Hang, T., Peiró, C., Soriano-Guillén, L., Egido, J., Tuñón, J., & Lorenzo, Ó. (2019). Predictive and diagnostic biomarkers for gestational diabetes and its associated metabolic and cardiovascular diseases. *Cardiovasc Diabetol*, *18*(1), 140. doi:10.1186/s12933-019-0935-9
- Luo, H., Liu, Y., Song, Y., Hua, Y., & Zhu, X. (2020). Aquaporin 1 affects pregnancy outcome and regulates aquaporin 8 and 9 expressions in the placenta. *Cell Tissue Res*, *381*(3), 543-554. doi:10.1007/s00441-020-03221-w
- Ma, R. Q., Sun, M. N., & Yang, Z. (2011). Inhibition of nitric oxide synthase lowers fatty acid oxidation in preeclampsia-like mice at early gestational stage. *Chin Med J (Engl)*, *124*(19), 3141-3147.
- Martínez, N., & Damiano, A. E. (2017). Aquaporins in Fetal Development. *Adv Exp Med Biol*, *969*, 199-212. doi:10.1007/978-94-024-1057-0_13

- Merech, F., Soczewski, E., Hauk, V., Papparini, D., Ramhorst, R., Vota, D., & Pérez Leirós, C. (2019). Vasoactive Intestinal Peptide induces glucose and neutral amino acid uptake through mTOR signalling in human cytotrophoblast cells. *Sci Rep*, *9*(1), 17152. doi:10.1038/s41598-019-53676-3
- Metzger, B. E., Gabbe, S. G., Persson, B., Buchanan, T. A., Catalano, P. A., Damm, P., . . . Schmidt, M. I. (2010). International association of diabetes and pregnancy study groups recommendations on the diagnosis and classification of hyperglycemia in pregnancy. *Diabetes Care*, *33*(3), 676-682. doi:10.2337/dc09-1848
- Metzger, B. E., Lowe, L. P., Dyer, A. R., Trimble, E. R., Chaovarindr, U., Coustan, D. R., . . . Sacks, D. A. (2008). Hyperglycemia and adverse pregnancy outcomes. *N Engl J Med*, *358*(19), 1991-2002. doi:10.1056/NEJMoa0707943
- Mikelis, C., Lamprou, M., Koutsidoumpa, M., Koutsidoubas, A. G., Spyraanti, Z., Zompra, A. A., . . . Papadimitriou, E. (2011). A peptide corresponding to the C-terminal region of pleiotrophin inhibits angiogenesis in vivo and in vitro. *J Cell Biochem*, *112*(6), 1532-1543. doi:10.1002/jcb.23066
- Mirra, P., Nigro, C., Prevezano, I., Leone, A., Raciti, G. A., Formisano, P., . . . Miele, C. (2018). The Destiny of Glucose from a MicroRNA Perspective. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *9*, 46. doi:10.3389/fendo.2018.00046
- Mishima, T., Miner, J. H., Morizane, M., Stahl, A., & Sadovsky, Y. (2011). The expression and function of fatty acid transport protein-2 and -4 in the murine placenta. *PLoS One*, *6*(10), e25865. doi:10.1371/journal.pone.0025865
- Moffett, J. R., Puthillathu, N., Vengilote, R., Jaworski, D. M., & Namboodiri, A. M. (2020). Acetate Revisited: A Key Biomolecule at the Nexus of Metabolism, Epigenetics and Oncogenesis-Part 1: Acetyl-CoA, Acetogenesis and Acyl-CoA Short-Chain Synthetases. *Front Physiol*, *11*, 580167. doi:10.3389/fphys.2020.580167
- Mohanraj, P. S., Rahat, B., Mahajan, A., Bagga, R., & Kaur, J. (2019). Temporal expression of genes involved in folate metabolism and transport during placental development, preeclampsia and neural tube defects. *Mol Biol Rep*, *46*(3), 3193-3201. doi:10.1007/s11033-019-04776-w
- Moon, J. H., & Jang, H. C. (2022). Gestational Diabetes Mellitus: Diagnostic Approaches and Maternal-Offspring Complications. *Diabetes Metab J*, *46*(1), 3-14. doi:10.4093/dmj.2021.0335
- Moore, K. L., Persaud, T. V. N., & Torchia, M. G. (2020). *Embriología clínica*: Elsevier.
- Myatt, L. (2002). Role of placenta in preeclampsia. *Endocrine*, *19*(1), 103-111. doi:10.1385/ENDO:19:1:103
- Nair, S., Guanzon, D., Jayabalan, N., Lai, A., Scholz-Romero, K., Kalita de Croft, P., . . . Salomon, C. (2021). Extracellular vesicle-associated miRNAs are an adaptive response to gestational diabetes mellitus. *J Transl Med*, *19*(1), 360. doi:10.1186/s12967-021-02999-9
- Nandi, A. A., Wadhvani, N. S., & Joshi, S. R. (2017). Altered metabolic homeostasis between vitamin D and long chain polyunsaturated fatty acids in preeclampsia. *Med Hypotheses*, *100*, 31-36. doi:10.1016/j.mehy.2017.01.009
- Nandi, A. A., Wadhvani, N. S., Randhir, K. N., Madiwale, S. D., Deshpande, J. S., Wagh, G. N., & Joshi, S. R. (2021). Maternal vitamin D deficiency influences long-chain polyunsaturated fatty acids and pregnancy outcome in association with alterations in one-carbon metabolism. *Nutr Res*, *86*, 37-49. doi:10.1016/j.nutres.2020.11.009
- Nirupama, R., Divyashree, S., Janhavi, P., Muthukumar, S. P., & Ravindra, P. V. (2021). Preeclampsia: Pathophysiology and management. *J Gynecol Obstet Hum Reprod*, *50*(2), 101975. doi:10.1016/j.jogoh.2020.101975
- Nogues, P., Dos Santos, E., Couturier-Tarrade, A., Berveiller, P., Arnould, L., Lamy, E., . . . Dieudonne, M. N. (2021). Maternal Obesity Influences Placental Nutrient Transport, Inflammatory Status, and Morphology in Human Term Placenta. *J Clin Endocrinol Metab*, *106*(4), e1880-e1896. doi:10.1210/clinem/dgaa660
- Nong, Y., Li, S., Liu, W., Zhang, X., Fan, L., Chen, Y., . . . Liu, F. (2021). Aquaporin 3 promotes human extravillous trophoblast migration and invasion. *Reprod Biol Endocrinol*, *19*(1), 49. doi:10.1186/s12958-021-00726-z
- Noury, A. E., Azmy, O., Alsharnoubi, J., Salama, S., Okasha, A., & Gouda, W. (2018). Variants of CDKAL1 rs7754840 (G/C) and CDKN2A/2B rs10811661 (C/T) with gestational diabetes: insignificant association. *BMC Res Notes*, *11*(1), 181. doi:10.1186/s13104-018-3288-7
- Núñez-Gómez, E., & Lopez-Novoa, J. (2015). Papel de endoglina en los eventos fisiológicos involucrados en la revascularización postisquémica. *Angiología*, *67*(3), 206-215.
- Okby, R., Harlev, A., Sacks, K. N., Sergienko, R., & Sheiner, E. (2018). Preeclampsia acts differently in in vitro fertilization versus spontaneous twins. *Arch Gynecol Obstet*, *297*(3), 653-658. doi:10.1007/s00404-017-4635-y
- Papadimitriou, E., Pantazaka, E., Castana, P., Tsaliou, T., Polyzos, A., & Beis, D. (2016). Pleiotrophin and its receptor protein tyrosine phosphatase beta/zeta as regulators of angiogenesis and cancer. *Biochim Biophys Acta*, *1866*(2), 252-265. doi:10.1016/j.bbcan.2016.09.007
- Parada-Niño, L., Castillo-León, L. F., & Morel, A. (2022). Preeclampsia, Natural History, Genes, and miRNAs Associated with the Syndrome. *J Pregnancy*, *2022*, 3851225. doi:10.1155/2022/3851225

- Pavic, M., Premuzic, V., Zovak Pavic, A., Bevanda, M., Mihaljevic, S., & Oreskovic, S. (2021). Prevalence of Gestational Diabetes Mellitus and Perinatal Outcomes According to the Old Who Criteria and IADPSG Criteria. *Psychiatr Danub*, 33(Suppl 10), 30-36.
- Pérez-Pérez, A., Vilariño-García, T., Dietrich, V., Guadix, P., Dueñas, J. L., Varone, C. L., . . . Sánchez-Margalet, V. (2020). Aquaporins and placenta. *Vitam Horm*, 112, 311-326. doi:10.1016/bs.vh.2019.10.003
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45. doi:10.1093/nar/29.9.e45
- Phipps, E. A., Thadhani, R., Benzing, T., & Karumanchi, S. A. (2019). Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies. *Nat Rev Nephrol*, 15(5), 275-289. doi:10.1038/s41581-019-0119-6
- Plows, J. F., Stanley, J. L., Baker, P. N., Reynolds, C. M., & Vickers, M. H. (2018). The Pathophysiology of Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*, 19(11). doi:10.3390/ijms19113342
- Popova, P. V., Klyushina, A. A., Vasilyeva, L. B., Tkachuk, A. S., Vasukova, E. A., Anopova, A. D., . . . Grineva, E. N. (2021). Association of Common Genetic Risk Variants With Gestational Diabetes Mellitus and Their Role in GDM Prediction. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 12, 628582. doi:10.3389/fendo.2021.628582
- Poulakos, P., Mintziori, G., Tsiros, E., Taousani, E., Savvaki, D., Harizopoulou, V., & Goulis, D. G. (2015). Comments on gestational diabetes mellitus: from pathophysiology to clinical practice. *Hormones (Athens)*, 14(3), 335-344. doi:10.14310/horm.2002.1570
- Przanowska, R. K., Sobierajska, E., Su, Z., Jensen, K., Przanowski, P., Nagdas, S., . . . Dutta, A. (2020). miR-206 family is important for mitochondrial and muscle function, but not essential for myogenesis in vitro. *FASEB J*, 34(6), 7687-7702. doi:10.1096/fj.201902855RR
- Rakheja, D., Bennett, M. J., Foster, B. M., Domiati-Saad, R., & Rogers, B. B. (2002). Evidence for fatty acid oxidation in human placenta, and the relationship of fatty acid oxidation enzyme activities with gestational age. *Placenta*, 23(5), 447-450. doi:10.1053/plac.2002.0808
- Rama, S., & Rao, A. J. (2003). Regulation of growth and function of the human placenta. *Mol Cell Biochem*, 253(1-2), 263-268. doi:10.1023/a:1026076219126
- Ramos, M. P., Crespo-Solans, M. D., del Campo, S., Cacho, J., & Herrera, E. (2003). Fat accumulation in the rat during early pregnancy is modulated by enhanced insulin responsiveness. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 285(2), E318-328. doi:10.1152/ajpendo.00456.2002
- Ramos, P., & Herrera, E. (1995). Reversion of insulin resistance in the rat during late pregnancy by 72-h glucose infusion. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 269(5), E858-E863.
- Rattanatham, R., Settasatian, N., Komanasin, N., Kukongviriyapan, U., Sawanyawisuth, K., Intharaphet, P., . . . Settasatian, C. (2021). Association of Combined TCF7L2 and KCNQ1 Gene Polymorphisms with Diabetic Micro- and Macrovascular Complications in Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes Metab J*, 45(4), 578-593. doi:10.4093/dmj.2020.0101
- Redline, R. W. (2003). Nonidentical twins with a single placenta--disproving dogma in perinatal pathology. *N Engl J Med*, 349(2), 111-114. doi:10.1056/NEJMp030097
- Robillard, P. Y., Dekker, G., Chaouat, G., Scioscia, M., Iacobelli, S., & Hulsey, T. C. (2017). Historical evolution of ideas on eclampsia/preeclampsia: A proposed optimistic view of preeclampsia. *J Reprod Immunol*, 123, 72-77. doi:10.1016/j.jri.2017.09.006
- Robillard, P. Y., Dekker, G., Scioscia, M., & Saito, S. (2022). Progress in the understanding of the pathophysiology of immunologic maladaptation related to early-onset preeclampsia and metabolic syndrome related to late-onset preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*, 226(2s), S867-s875. doi:10.1016/j.ajog.2021.11.019
- Robinson, M. D., & Oshlack, A. (2010). A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol*, 11(3), R25. doi:10.1186/gb-2010-11-3-r25
- Rosenfeld, C. S. (2021). The placenta-brain-axis. *J Neurosci Res*, 99(1), 271-283. doi:10.1002/jnr.24603
- Rowson, S., Reddy, M., De Guingand, D. L., Langston-Cox, A., Marshall, S. A., da Silva Costa, F., & Palmer, K. R. (2022). Comparison of circulating total sFLT-1 to placental-specific sFLT-1 e15a in women with suspected preeclampsia. *Placenta*, 120, 73-78. doi:10.1016/j.placenta.2022.02.017
- Saben, J., Zhong, Y., McKelvey, S., Dajani, N. K., Andres, A., Badger, T. M., . . . Shankar, K. (2014). A comprehensive analysis of the human placenta transcriptome. *Placenta*, 35(2), 125-131. doi:10.1016/j.placenta.2013.11.007
- Sadler, T. W. (2019). *Embriología médica* (14ª Edición ed.): LIPPINCOTT WILLIAMS AND WILKINS. WOLTERS KLUWER HEALTH.
- Sasagawa, T., Nagamatsu, T., Yanagisawa, M., Fujii, T., & Shibuya, M. (2021). Hypoxia-inducible factor-1 β is essential for upregulation of the hypoxia-induced FLT1 gene in placental trophoblasts. *Mol Hum Reprod*, 27(12). doi:10.1093/molehr/gaab065

- Scoville, D. W., Kang, H. S., & Jetten, A. M. (2020). Transcription factor GLIS3: Critical roles in thyroid hormone biosynthesis, hypothyroidism, pancreatic beta cells and diabetes. *Pharmacol Ther*, *215*, 107632. doi:10.1016/j.pharmthera.2020.107632
- Shaat, N., Ekelund, M., Lernmark, A., Ivarsson, S., Almgren, P., Berntorp, K., & Groop, L. (2005). Association of the E23K polymorphism in the KCNJ11 gene with gestational diabetes mellitus. *Diabetologia*, *48*(12), 2544-2551. doi:10.1007/s00125-005-0035-0
- Shahid, R., Bari, M. F., & Hussain, M. (2022). Serum biomarkers for the prediction and diagnosis of preeclampsia: A meta-analysis. *J Taibah Univ Med Sci*, *17*(1), 14-27. doi:10.1016/j.jtumed.2021.07.003
- Shan, D., Li, J. L., Wu, L., Li, D., Hurov, J., Tobin, J. F., . . . Cao, J. (2010). GPAT3 and GPAT4 are regulated by insulin-stimulated phosphorylation and play distinct roles in adipogenesis. *J Lipid Res*, *51*(7), 1971-1981. doi:10.1194/jlr.M006304
- Shao, H., Gao, S., Ying, X., Zhu, X., & Hua, Y. (2021). Expression and Regulation of Aquaporins in Pregnancy Complications and Reproductive Dysfunctions. *DNA Cell Biol*, *40*(1), 116-125. doi:10.1089/dna.2020.5983
- Sheng, C., Zhao, Y., & Zhu, L. (2020). Down-regulation of EDN1 gene expression by circulating miR-206 is associated with risk of preeclampsia. *Medicine (Baltimore)*, *99*(22), e20319. doi:10.1097/md.00000000000020319
- Shibuya, M., Matsui, H., Sasagawa, T., & Nagamatsu, T. (2021). A simple detection method for the serum sFLT1 protein in preeclampsia. *Sci Rep*, *11*(1), 20613. doi:10.1038/s41598-021-00152-6
- Singh, K. P., Maremanda, K. P., Li, D., & Rahman, I. (2020). Exosomal microRNAs are novel circulating biomarkers in cigarette, waterpipe smokers, E-cigarette users and dual smokers. *BMC Med Genomics*, *13*(1), 128. doi:10.1186/s12920-020-00748-3
- Singh, S. P., Devadoss, D., Manevski, M., Sheybani, A., Ivanciuc, T., Exil, V., . . . Sopori, M. L. (2020). Gestational Exposure to Cigarette Smoke Suppresses the Gasotransmitter H(2)S Biogenesis and the Effects Are Transmitted Transgenerationally. *Front Immunol*, *11*, 1628. doi:10.3389/fimmu.2020.01628
- Sociedad Española de Ginecología y Obstetricia. (2016). Embarazo gemelar bicorial. *Prog. obstet. ginecol.(Ed. impr.)*, 43-57.
- Solanky, N., Requena Jimenez, A., D'Souza, S. W., Sibley, C. P., & Glazier, J. D. (2010). Expression of folate transporters in human placenta and implications for homocysteine metabolism. *Placenta*, *31*(2), 134-143. doi:10.1016/j.placenta.2009.11.017
- Sonne, S. R., Bhalla, V. K., Barman, S. A., White, R. E., Zhu, S., Newman, T. M., . . . Ganapathy, V. (2013). Hyperhomocysteinemia is detrimental to pregnancy in mice and is associated with preterm birth. *Biochim Biophys Acta*, *1832*(8), 1149-1158. doi:10.1016/j.bbadis.2013.04.006
- St-Pierre, J., Grégoire, J. C., & Vaillancourt, C. (2017). A simple method to assess group difference in RT-qPCR reference gene selection using GeNorm: The case of the placental sex. *Sci Rep*, *7*(1), 16923. doi:10.1038/s41598-017-16916-y
- Stepan, H., Hund, M., & Andrzejczak, T. (2020). Combining Biomarkers to Predict Pregnancy Complications and Redefine Preeclampsia: The Angiogenic-Placental Syndrome. *Hypertension*, *75*(4), 918-926. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.119.13763
- Stephens, L., Eguinoa, A., Corey, S., Jackson, T., & Hawkins, P. T. (1993). Receptor stimulated accumulation of phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate by G-protein mediated pathways in human myeloid derived cells. *Embo j*, *12*(6), 2265-2273.
- Strauss, A. W., Bennett, M. J., Rinaldo, P., Sims, H. F., O'Brien, L. K., Zhao, Y., . . . Ibdah, J. (1999). Inherited long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency and a fetal-maternal interaction cause maternal liver disease and other pregnancy complications. *Semin Perinatol*, *23*(2), 100-112. doi:10.1016/s0146-0005(99)80044-5
- Stuebe, A. M., Wise, A., Nguyen, T., Herring, A., North, K. E., & Siega-Riz, A. M. (2014). Maternal genotype and gestational diabetes. *Am J Perinatol*, *31*(1), 69-76. doi:10.1055/s-0033-1334451
- Suder, A. M., Gniadek, A. J., Micek, A. M., & Pawlik, D. W. (2021). Functional development of preterm children born from singleton and multiple pregnancies: Preliminary study. *J Mother Child*, *25*(1), 3-8. doi:10.34763/jmotherandchild.20212501.d-20-00002
- Sun, X. L., Yang, Z., Wang, J. L., Sun, M. N., Wu, S. Y., & Wang, X. Y. (2011). [Correlation between severe preeclampsia and abnormal expression of long-chain fatty acid oxidative enzyme]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, *91*(29), 2026-2029.
- Sun, X. L., Yang, Z., Wang, W., Wang, X. Y., Wang, J. L., & Wu, S. Y. (2013). [Interaction mechanism and influence between fatty acid oxidation in trophoblast cells and p38MAPK signal transduction pathway of severe preeclampsia]. *Zhonghua Fu Chan Ke Za Zhi*, *48*(11), 853-857.
- Tabrizi, R., Asemi, Z., Lankarani, K. B., Akbari, M., Khatibi, S. R., Naghibzadeh-Tahami, A., . . . Moosazadeh, M. (2019). Gestational diabetes mellitus in association with macrosomia in Iran: a meta-analysis. *J Diabetes Metab Disord*, *18*(1), 41-50. doi:10.1007/s40200-019-00388-0

- Tang, R., Ma, F., Li, W., Ouyang, S., Liu, Z., & Wu, J. (2017). miR-206-3p Inhibits 3T3-L1 Cell Adipogenesis via the c-Met/PI3K/Akt Pathway. *Int J Mol Sci*, *18*(7). doi:10.3390/ijms18071510
- Tang, Y., Zhou, J., Hooi, S. C., Jiang, Y. M., & Lu, G. D. (2018). Fatty acid activation in carcinogenesis and cancer development: Essential roles of long-chain acyl-CoA synthetases. *Oncol Lett*, *16*(2), 1390-1396. doi:10.3892/ol.2018.8843
- Taniguchi, K., Sugito, N., Shinohara, H., Kuranaga, Y., Inomata, Y., Komura, K., . . . Akao, Y. (2018). Organ-Specific MicroRNAs (MIR122, 137, and 206) Contribute to Tissue Characteristics and Carcinogenesis by Regulating Pyruvate Kinase M1/2 (PKM) Expression. *Int J Mol Sci*, *19*(5). doi:10.3390/ijms19051276
- Tarca, A. L., Romero, R., Benschalom-Tirosh, N., Than, N. G., Gudicha, D. W., Done, B., . . . Erez, O. (2019). The prediction of early preeclampsia: Results from a longitudinal proteomics study. *PLoS One*, *14*(6), e0217273. doi:10.1371/journal.pone.0217273
- Tarnowski, M., Bujak, J., Kopytko, P., Majcher, S., Ustianowski, P., Dziedziejko, V., . . . Pawlik, A. (2019). Effect of FTO and IGF2BP2 gene polymorphisms on duration of pregnancy and Apgar scores in women with gestational diabetes. *J Obstet Gynaecol*, *39*(2), 151-156. doi:10.1080/01443615.2018.1502263
- Tarnowski, M., Malinowski, D., Pawlak, K., Dziedziejko, V., Safranow, K., & Pawlik, A. (2017). GCK, GCKR, FADS1, DGKB/TMEM195 and CDKAL1 Gene Polymorphisms in Women with Gestational Diabetes. *Can J Diabetes*, *41*(4), 372-379. doi:10.1016/j.cjcd.2016.11.009
- Teleginski, A., Welter, M., Frigeri, H. R., Réa, R. R., Souza, E. M., Alberton, D., . . . Picheth, G. (2017). Leptin (rs7799039) and solute carrier family 30 zinc transporter (rs13266634) polymorphisms in Euro-Brazilian pregnant women with gestational diabetes. *Genet Mol Res*, *16*(1). doi:10.4238/gmr16019515
- Tomita, Y., Dorward, H., Yool, A. J., Smith, E., Townsend, A. R., Price, T. J., & Hardingham, J. E. (2017). Role of Aquaporin 1 Signalling in Cancer Development and Progression. *Int J Mol Sci*, *18*(2). doi:10.3390/ijms18020299
- Traberg-Nyborg, L., Login, F. H., Edamana, S., Tramm, T., Borgquist, S., & Nejsum, L. N. (2022). Aquaporin-1 in breast cancer. *Apmis*, *130*(1), 3-10. doi:10.1111/apm.13192
- Tsai, K., Tullis, B., Jensen, T., Graff, T., Reynolds, P., & Arroyo, J. (2021). Differential expression of mTOR related molecules in the placenta from gestational diabetes mellitus (GDM), intrauterine growth restriction (IUGR) and preeclampsia patients. *Reprod Biol*, *21*(2), 100503. doi:10.1016/j.repbio.2021.100503
- Tsai, P. J., Ho, S. C., Tsai, L. P., Lee, Y. H., Hsu, S. P., Yang, S. P., . . . Yu, C. H. (2004). Lack of relationship between beta3-adrenergic receptor gene polymorphism and gestational diabetes mellitus in a Taiwanese population. *Metabolism*, *53*(9), 1136-1139. doi:10.1016/j.metabol.2004.04.006
- Tyni, T., & Pihko, H. (1999). Long-chain 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Acta Paediatr*, *88*(3), 237-245. doi:10.1080/08035259950169954
- Valdearcos, M., Esquinas, E., Meana, C., Peña, L., Gil-de-Gómez, L., Balsinde, J., & Balboa, M. A. (2012). Lipin-2 reduces proinflammatory signaling induced by saturated fatty acids in macrophages. *J Biol Chem*, *287*(14), 10894-10904. doi:10.1074/jbc.M112.342915
- Valencia-Ortega, J., Saucedo, R., Sánchez-Rodríguez, M. A., Cruz-Durán, J. G., & Martínez, E. G. R. (2021). Epigenetic Alterations Related to Gestational Diabetes Mellitus. *Int J Mol Sci*, *22*(17). doi:10.3390/ijms22179462
- van Poppel, M. N. M., Corcoy, R., Hill, D., Simmons, D., Mendizabal, L., Zulueta, M., . . . Desoye, G. (2022). Interaction between rs10830962 polymorphism in MTNR1B and lifestyle intervention on maternal and neonatal outcomes: secondary analyses of the DALI lifestyle randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr*, *115*(2), 388-396. doi:10.1093/ajcn/nqab347
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, *3*(7), Research0034. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034
- Varì, R., Scazzocchio, B., Filardi, T., Citarella, A., Bellenghi, M., Masella, R., & Santangelo, C. (2021). Significance of Sex Differences in ncRNAs Expression and Function in Pregnancy and Related Complications. *Biomedicines*, *9*(11). doi:10.3390/biomedicines9111509
- Visiedo, F., Bugatto, F., Carrasco-Fernández, C., Sáez-Benito, A., Mateos, R. M., Cózar-Castellano, I., . . . Perdomo, G. (2015). Hepatocyte growth factor is elevated in amniotic fluid from obese women and regulates placental glucose and fatty acid metabolism. *Placenta*, *36*(4), 381-388. doi:10.1016/j.placenta.2015.01.199
- Vogtman, R., Kühnel, E., Dicke, N., Verkaik-Schakel, R. N., Plösch, T., Schorle, H., . . . Gellhaus, A. (2019). Human sFLT1 Leads to Severe Changes in Placental Differentiation and Vascularization in a Transgenic hsFLT1/rtTA FGR Mouse Model. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *10*, 165. doi:10.3389/fendo.2019.00165
- Wang, B., Xu, T., Li, Y., Wang, W., Lyu, C., Luo, D., . . . Li, J. (2020). Trophoblast H2S Maintains Early Pregnancy via Regulating Maternal-Fetal Interface Immune Hemostasis. *J Clin Endocrinol Metab*, *105*(12), e4275-4289. doi:10.1210/clinem/dgaa357

- Wang, J. L., Yang, Z., Wang, R., & Zhu, J. M. (2008). [Interaction among abnormal fatty acid oxidation, endothelial function disorder, and oxidative stress in the onset of severe preeclampsia]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, *88*(21), 1471-1475.
- Wang, X., Li, W., Ma, L., Ping, F., Liu, J., Wu, X., . . . Nie, M. (2017). Investigation of miRNA-binding site variants and risk of gestational diabetes mellitus in Chinese pregnant women. *Acta Diabetol*, *54*(3), 309-316. doi:10.1007/s00592-017-0969-y
- Wang, Y., Nie, M., Li, W., Ping, F., Hu, Y., Ma, L., . . . Liu, J. (2011). Association of six single nucleotide polymorphisms with gestational diabetes mellitus in a Chinese population. *PLoS One*, *6*(11), e26953. doi:10.1371/journal.pone.0026953
- Wang, Y., Shi, H., Chen, L., Zheng, D., Long, X., Zhang, Y., . . . Qiao, J. (2021). Absolute Risk of Adverse Obstetric Outcomes Among Twin Pregnancies After In Vitro Fertilization by Maternal Age. *JAMA Netw Open*, *4*(9), e2123634. doi:10.1001/jamanetworkopen.2021.23634
- Wang, Y., Wang, P., Zhao, L., Chen, X., Lin, Z., Zhang, L., & Li, Z. (2021). miR-224-5p Carried by Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells-Derived Exosomes Regulates Autophagy in Breast Cancer Cells via HOXA5. *Front Cell Dev Biol*, *9*, 679185. doi:10.3389/fcell.2021.679185
- Wang, Y., Zhang, M., Bi, R., Su, Y., Quan, F., Lin, Y., . . . Gao, X. (2022). ACSL4 deficiency confers protection against ferroptosis-mediated acute kidney injury. *Redox Biol*, *51*, 102262. doi:10.1016/j.redox.2022.102262
- Watahiki, A., Shimizu, K., Hoshikawa, S., Chiba, M., Kitamura, H., Egusa, H., . . . Inuzuka, H. (2020). Lipin-2 degradation elicits a proinflammatory gene signature in macrophages. *Biochem Biophys Res Commun*, *524*(2), 477-483. doi:10.1016/j.bbrc.2020.01.119
- Weedon-Fekjær, M. S., Johnsen, G. M., Anthonisen, E. H., Sugulle, M., Nebb, H. I., Duttaroy, A. K., & Staff, A. C. (2010). Expression of liver X receptors in pregnancies complicated by preeclampsia. *Placenta*, *31*(9), 818-824. doi:10.1016/j.placenta.2010.06.015
- Wei, W., He, Y., Wang, X., Tan, G., Zhou, F., Zheng, G., . . . Yu, H. (2021). Gestational Diabetes Mellitus: The Genetic Susceptibility Behind the Disease. *Horm Metab Res*, *53*(8), 489-498. doi:10.1055/a-1546-1652
- Whitley, G. S., & Cartwright, J. E. (2010). Cellular and molecular regulation of spiral artery remodelling: lessons from the cardiovascular field. *Placenta*, *31*(6), 465-474. doi:10.1016/j.placenta.2010.03.002
- Williams, D. (2011). Long-term complications of preeclampsia. *Semin Nephrol*, *31*(1), 111-122. doi:10.1016/j.semnephrol.2010.10.010
- Wu, H., Zhang, T., Pan, F., Steer, C. J., Li, Z., Chen, X., & Song, G. (2017). MicroRNA-206 prevents hepatosteatosis and hyperglycemia by facilitating insulin signaling and impairing lipogenesis. *J Hepatol*, *66*(4), 816-824. doi:10.1016/j.jhep.2016.12.016
- Wu, H. Y., Wang, X. H., Liu, K., & Zhang, J. L. (2020). LncRNA MALAT1 regulates trophoblast cells migration and invasion via miR-206/IGF-1 axis. *Cell Cycle*, *19*(1), 39-52. doi:10.1080/15384101.2019.1691787
- Wu, L., Cui, L., Tam, W. H., Ma, R. C., & Wang, C. C. (2016). Genetic variants associated with gestational diabetes mellitus: a meta-analysis and subgroup analysis. *Sci Rep*, *6*, 30539. doi:10.1038/srep30539
- Wu, L., Fang, C., Zhang, J., Ye, Y., & Zhao, H. (2021). The Association between Maternal/Fetal Insulin Receptor Substrate 1 Gene Polymorphism rs1801278 and Gestational Diabetes Mellitus in a Chinese Population. *Gynecol Obstet Invest*, *86*(1-2), 177-184. doi:10.1159/000514971
- Xu, J., Lu, C., Wang, J., Zhang, R., Qian, X., & Zhu, H. (2015). Regulation of Human Trophoblast GLUT3 Glucose Transporter by Mammalian Target of Rapamycin Signaling. *Int J Mol Sci*, *16*(6), 13815-13828. doi:10.3390/ijms160613815
- Yang, H., Guo, F., Guo, Q., Wang, Y., He, P., Zhang, H., & Wang, S. (2022). The clinical value of PIGF and the sFlt1/PIGF ratio in the management of hypertensive pregnancy disorders: A retrospective real-world study in China. *Clin Chim Acta*, *528*, 90-97. doi:10.1016/j.cca.2022.01.021
- Yang, L., Li, L., Ma, J., Yang, S., Zou, C., & Yu, X. (2019). miRNA and mRNA Integration Network Construction Reveals Novel Key Regulators in Left-Sided and Right-Sided Colon Adenocarcinoma. *Biomed Res Int*, *2019*, 7149296. doi:10.1155/2019/7149296
- Yang, S., Zheng, W., Yang, C., Zu, R., Ran, S., Wu, H., . . . Guan, Y. (2021). Integrated Analysis of Hub Genes and MicroRNAs in Human Placental Tissues from In Vitro Fertilization-Embryo Transfer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *12*, 774997. doi:10.3389/fendo.2021.774997
- Yang, X., Glazebrook, P., Ranasinghe, G. C., Haghiac, M., Calabuig-Navarro, V., Minium, J., & O'Tierney-Ginn, P. (2019). Fatty acid transporter expression and regulation is impaired in placental macrovascular endothelial cells in obese women. *J Matern Fetal Neonatal Med*, *32*(6), 971-978. doi:10.1080/14767058.2017.1397119
- Yong, H. E. J., & Chan, S. Y. (2020). Current approaches and developments in transcript profiling of the human placenta. *Hum Reprod Update*, *26*(6), 799-840. doi:10.1093/humupd/dmaa028

- Yu, H., Yang, Z., Ding, X., Wang, Y., & Han, Y. (2014). Correlation between the different chain lengths of free fatty acid oxidation and ability of trophoblastic invasion. *Chin Med J (Engl)*, *127*(19), 3378-3382.
- Yu, J., Loh, K., Song, Z. Y., Yang, H. Q., Zhang, Y., & Lin, S. (2018). Update on glycerol-3-phosphate acyltransferases: the roles in the development of insulin resistance. *Nutr Diabetes*, *8*(1), 34. doi:10.1038/s41387-018-0045-x
- Yu, X. Y., Song, L. P., Wei, S. D., Wen, X. L., & Liu, D. B. (2021). CDK5 Regulatory Subunit-Associated Protein 1-Like 1 Gene Polymorphisms and Gestational Diabetes Mellitus Risk: A Trial Sequential Meta-Analysis of 13,306 Subjects. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *12*, 722674. doi:10.3389/fendo.2021.722674
- Zera, C. A., & Seely, E. W. (2021). Controversies in Gestational Diabetes. *touchREV Endocrinol*, *17*(2), 102-107. doi:10.17925/ee.2021.17.2.102
- Zhang, T. N., Wang, W., Huang, X. M., & Gao, S. Y. (2021). Non-Coding RNAs and Extracellular Vehicles: Their Role in the Pathogenesis of Gestational Diabetes Mellitus. *Front Endocrinol (Lausanne)*, *12*, 664287. doi:10.3389/fendo.2021.664287
- Zhang, Y., Ding, S., Shen, Q., Wu, J., & Zhu, X. (2012). The expression and regulation of aquaporins in placenta and fetal membranes. *Front Biosci (Landmark Ed)*, *17*, 2371-2382. doi:10.2741/4058
- Zhang, Y., Sun, C. M., Hu, X. Q., & Zhao, Y. (2014). Relationship between melatonin receptor 1B and insulin receptor substrate 1 polymorphisms with gestational diabetes mellitus: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep*, *4*, 6113. doi:10.1038/srep06113
- Zhang, Y., Sun, X., Icli, B., & Feinberg, M. W. (2017). Emerging Roles for MicroRNAs in Diabetic Microvascular Disease: Novel Targets for Therapy. *Endocr Rev*, *38*(2), 145-168. doi:10.1210/er.2016-1122
- Zhao, H., Wong, R. J., & Stevenson, D. K. (2021). The Impact of Hypoxia in Early Pregnancy on Placental Cells. *Int J Mol Sci*, *22*(18). doi:10.3390/ijms22189675
- Zhao, L., Sun, L., Zheng, X., Liu, J., Zheng, R., Yang, R., & Wang, Y. (2020). In vitro fertilization and embryo transfer alter human placental function through trophoblasts in early pregnancy. *Mol Med Rep*, *21*(4), 1897-1909. doi:10.3892/mmr.2020.10971
- Zhao, L., Zhang, X., Shi, Y., & Teng, T. (2020). LncRNA SNHG14 contributes to the progression of NSCLC through miR-206/G6PD pathway. *Thorac Cancer*, *11*(5), 1202-1210. doi:10.1111/1759-7714.13374
- Zhao, L., Zheng, X., Liu, J., Zheng, R., Yang, R., Wang, Y., & Sun, L. (2019). The placental transcriptome of the first-trimester placenta is affected by in vitro fertilization and embryo transfer. *Reprod Biol Endocrinol*, *17*(1), 50. doi:10.1186/s12958-019-0494-7
- Zhao, X., Dou, J., Cao, J., Wang, Y., Gao, Q., Zeng, Q., . . . Zhao, C. (2020). Uncovering the potential differentially expressed miRNAs as diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma based on machine learning in The Cancer Genome Atlas database. *Oncol Rep*, *43*(6), 1771-1784. doi:10.3892/or.2020.7551
- Zhong, D., Huang, G., Zhang, Y., Zeng, Y., Xu, Z., Zhao, Y., . . . He, F. (2013). MicroRNA-1 and microRNA-206 suppress LXR α -induced lipogenesis in hepatocytes. *Cell Signal*, *25*(6), 1429-1437. doi:10.1016/j.cellsig.2013.03.003
- Zhou, F., Li, S., Meng, H. M., Qi, L. Q., & Gu, L. (2013). MicroRNA and histopathological characterization of pure mucinous breast carcinoma. *Cancer Biol Med*, *10*(1), 22-27. doi:10.7497/j.issn.2095-3941.2013.01.004
- Zhou, J., Yang, Y., Zhang, Y., Liu, H., & Dou, Q. (2018). A meta-analysis on the role of pleiotrophin (PTN) as a prognostic factor in cancer. *PLoS One*, *13*(11), e0207473. doi:10.1371/journal.pone.0207473

Algunas de las imágenes elaboradas en este documento fueron hechas con *Biorender*.

